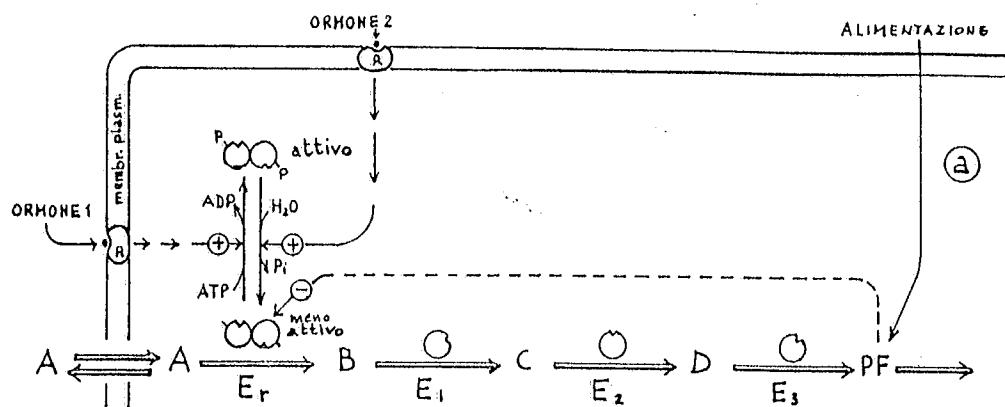


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

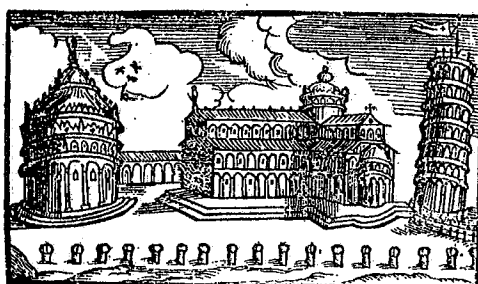
L'AFFINITÀ E LA CONCENTRAZIONE
I MECCANISMI MOLECOLARI DELLA REGOLAZIONE
DEL METABOLISMO

FRANCO GABRIELLI DI QUERCITA



SEU

Servizio Editoriale di Pisa



Piazza dei Miracoli

stampeur piano del XVIII secolo

L'Azienda Comunale per il Diritto allo Studio Universitario ha determinato il prezzo della presente pubblicazione calcolando i soli costi di produzione nell'ambito della politica regionale per il diritto allo studio universitario.

Si dice che la cultura europea indaghi
per capire la natura delle cose,
mentre quella nord-americana
per capire il loro funzionamento.
I due tipi di cultura si fondono quando si studiano
i meccanismi molecolari di regolazione,
perchè
lo studio del "cosa è" è anche quello del "come funziona"

Ringrazio per le utili discussioni i professori Carlo Bauer,
Massimo Coletta, Paolo Gianni, Maurizio Zandomeneghi ed il
dottor Lorenzo Lorenzoni.
Ringrazio gli studenti del corso di Biochimica 2^o dal 1974
ad oggi, che con le loro intelligenti domande e le loro
intelligenti risposte mi hanno stimolato a scrivere. Spero
che ciò che ho scritto sia utile agli studenti che verranno.
Ringrazio per i disegni il tecnico signor Piero Bertelli.
Ringrazio per la collaborazione il personale del Servizio
Editoriale del Comitato di Gestione per il Diritto allo
Studio Universitario "Area Pisana".
Ringrazio i miei figli Gabriel ed Albis per l'aiuto che mi
hanno dato al computer durante la preparazione del
manoscritto. Senza la loro collaborazione non avrei concluso
il mio lavoro.

INDICE

Capitolo 1 Pag. 1.

L'affinità e la concentrazione. L'equilibrio chimico e la cinetica chimica.

Capitolo 2 Pag. 59.

Reazioni di associazione tra proteina e legante: affinità, specificità, velocità di formazione, di dissociazione e stabilità dei complessi proteina-legante.

Capitolo 3 Pag. 127.

Meccanismi molecolari che inducono cambiamenti di conformazione delle proteine regolate: reazioni covalenti ed effettori allosterici.

Capitolo 4 Pag. 189.

Regolazione dell'attività biologica delle proteine.
Regolazione degli enzimi.

Capitolo 5 Pag. 222.

La via metabolica: struttura, termodinamica e regolazione

Capitolo 6 Pag. 277.

Proteine di deposito e di trasporto. Emoglobina: struttura, funzione, regolazione cooperativa dell'ossigenazione e regolazione allosterica.

Capitolo 7 Pag. 394.

Regolazione del metabolismo nei tessuti umani. Regolazione del metabolismo energetico nelle fibre muscolari. Biochimica della corsa podistica.

Bibliografia Pag. 546.

ABBREVIAZIONI

Enzimi:

AdC = Adenilato cinasi (miocinasi)
ACC = Acetil-CoA carbossilasi
ACT-I = Acetil-carnitina transferasi I
ACT II = Acetil-carnitina transferasi II
CS = Citrato sintetasi
FFC = Fosfofruttocinasi
3PGal-DH = 3P-Gliceraldeide deidrogenasi
GDH = Glutamato deidrogenasi
GTP = Glutamato Piruvico transaminasi
IDH = Isocitrato deidrogenasi
 α KGDH = α Chetoglutarato deidrogenasi
PC = Piruvato cinasi
PCa = Piruvato carbossilasi
PDH = Piruvato deidrogenasi
PEPCO₂C = Fosfoenolpiruvato-carbossi cinasi

Metaboliti:

aa = Aminoacidi
AAA = Aceto-acetato
AAL = Acido δ amino-levulinico
AIB = β Idrossi-butirrato
ALA = Alanina
AOA = Ossalacetato
diOH-AP = di-idrossi acetonfosfato
ASP = Aspartato
C.C. = Corpi chetonici
GLU = Glutamato
GLUC = Glucosio
GLN = Glutamina
G6P = Glucoso-6-fosfato
 α GP = α glicerofosfato
eIF2 = fattore di iniziazione 2 degli eucarioti
FGP = Fruttosio-6-fosfato
LAT = Lattato
MAL = Malato
NAD⁺ = Nicotinamide-adenin-dinucleotide
NAD⁺m = Nicotinamide-adenin-dinucleotide mitocondriale
PBG = Porfobilinogeno
PEP = Fosfoenolpiruvato
PIR = Piruvato
PRPP = 5-P-Ribosil-1P
2PGA = 2-fosfoglicerato
6PGl = 6P-glucono-lattone
RIB = Ribosio

Altri:

Css = concentrazione allo stato stazionario
m.p. = membrana plasmatica
m.m.i. = membrana mitocondriale interna
m.m.e. = membrana mitocondriale esterna

Capitolo 1

L'AFFINITÀ, LA CONCENTRAZIONE E L'EQUILIBRIO CHIMICO

Gli esseri viventi sono costituiti da molecole, piccole molecole (metaboliti semplici e complessi) e da macromolecole (polimeri di metaboliti). La struttura stabile di queste molecole è costituita da 6 specie di atomo (C, H, O, N, P, S) uniti da legami covalenti. I meccanismi molecolari di regolazione presenti negli esseri viventi operano attraverso cambiamenti di concentrazione di molecole e per cambiamenti di affinità tra molecole. I cambiamenti di concentrazione interessano piccole molecole e macromolecole ed i cambiamenti di affinità interessano le reazioni di associazione (reazioni che avvengono mediante la formazione di interazioni deboli) tra proteine e piccole molecole e tra proteine e macromolecole (proteine, acidi nucleici, carboidrati). Questi cambiamenti di concentrazione e di affinità risultano in cambiamenti nello stato di equilibrio o nella tendenza a raggiungere l'equilibrio di reazioni di associazione al fine poi di rallentare o di accelerare il raggiungimento dell'equilibrio di reazioni covalenti mediante cambiamenti di concentrazione dei reagenti e di attività di catalisi degli enzimi.

Le reazioni covalenti sono classificabili in tre gruppi:

- a) reazioni di fosforilazione e di defosforilazione delle proteine. Queste reazioni realizzano rispettivamente la legatura di un gruppo fosfato ceduto dall'ATP, ad un residuo di serina, treonina o tirosina, di una proteina e l'idrolisi dello stesso gruppo dagli stessi residui. Queste reazioni fanno parte del meccanismo molecolare di regolazione dell'attività biologica delle proteine operato dagli ormoni, fattori di crescita ed, almeno in due casi da effettori.
- b) reazioni cataboliche che degradano le macromolecole in piccole molecole (metaboliti) e poi le piccole molecole in anidride carbonica, acqua, urea ed altre molecole di escrezione con conservazione dell'energia libera nei legami fosfo-anidridici dell'ATP e GTP.
- b) reazioni anaboliche che da metaboliti semplici portano alla formazione di molecole organiche più o meno complesse (metaboliti complessi: trigliceridi, fosfolipidi, basi puriniche e pirimidiniche, ecc. e mediatori di regolazione: cAMP, inositolo-trifosfato, ecc.) e di macromolecole (glicogeno, proteine, RNA, DNA).

Queste molecole e macromolecole sono i componenti cellulari che costituiscono le proprietà funzionali e strutturali

delle cellule e degli organi subcellulari, delle strutture extracellulari che permettono l'aggregazione delle cellule in tessuti ed organi fino alla costituzione dell'organismo. La cellula, gli organi e l'organismo non sono altro che un insieme di prodotti finali di molte vie metaboliche. L'esistenza e la regolazione delle vie di sintesi e di degradazione di questi prodotti finali, è il risultato di un ordinato giuoco di spostamenti di equilibri di reazioni covalenti controllate da reazioni di associazione tra proteine e molecole.

Due tipi di stimolo attivano i meccanismi molecolari di regolazione degli esseri viventi.

Uno è la continua richiesta di energia che viene presa dall'esterno sotto forma di molecole (alimenti). Una volta introdotti nell'organismo, gli alimenti inducono le cellule di tessuti ed organi a rispondere alla loro introduzione. La risposta è automatica e diversa in relazione alla natura chimica degli alimenti, al tipo di cellula stimolata ed in relazione allo stato di differenziamento della cellula stessa.

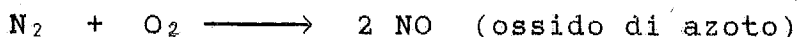
Gli altri tipi di stimolo provengono dall'ambiente e sono mediati dagli organi di senso e dal sistema nervoso. Il sistema nervoso agisce sulle cellule direttamente e/o via il sistema ormonale.

Il perchè ed il come delle risposte di un organismo ai due tipi di stimolo, è nella costituzione genetica dell'organismo stesso, cioè nel modo in cui è costruita la macchina biologica. Essa è costruita per esecuzione di un programma scritto nel DNA della cellula uovo fecondata e condizionato nel tempo dall'alimentazione e dall'ambiente fisico, chimico e culturale. Nell'ambito di uno stesso organismo il programma è identico ma la regolazione della sua realizzazione è diversa in cellule di tipo diverso e può essere diversa in cellule dello stesso tipo in tempi diversi in relazione ad indicazioni del programma stesso (sviluppo embrionale, organogenesi), all'alimentazione ed all'azione dell'ambiente (radiazioni, composti inquinanti ecc.).

Equilibrio chimico.

L'equilibrio chimico è un equilibrio dinamico. La velocità con la quale normalmente procede una reazione chimica dipende dalla concentrazione delle sostanze che reagiscono. Questo è facilmente intuibile perchè le reazioni chimiche procedono quando le molecole vengono in contatto, quindi più molecole ci sono per unità di volume, più frequenti saranno le possibilità di contatto.

Se ammettiamo che nella reazione:



la velocità di reazione dipenda dalla frequenza degli urti che avvengono tra singole molecole di O_2 e di N_2 , ne consegue che la velocità di reazione (v_1) è proporzionale alla concentrazione di O_2 e N_2 .

$$v_1 = k_1 [\text{O}_2] \cdot [\text{N}_2]$$

K_1 è la costante cinetica della reazione come scritta, da sinistra verso destra, ed aumenta in valore con l'aumentare della temperatura (T) perchè con l'aumentare della temperatura aumenta la frequenza e la forza degli urti tra molecole e quindi la v_1 delle reazioni.

Con il procedere la reazione diviene progressivamente più lenta perchè le concentrazioni dei reagenti (O_2 e N_2 nell'esempio) diminuiscono, e quindi la frequenza degli urti tra queste molecole diminuisce. Inoltre, con il procedere della reazione verso destra si formano e si concentrano progressivamente i prodotti (tenendo V e P costanti) ed inizia a procedere la reazione in senso opposto, da destra verso sinistra. Cioè, quando le due molecole di NO (prodotte) si incontrano e riformano due molecole dei reagenti iniziali O_2 ed N_2 . Anche la velocità (v_2) della reazione inversa è proporzionale alla concentrazione delle molecole che si incontrano e la relativa costante cinetica k_2 è anch'essa incrementata dalla T .

$$v_2 = k_2 [\text{NO}] [\text{NO}]$$

Nella reazione presa come esempio i prodotti di reazione sono identici, per cui la v_2 risulta proporzionale al quadrato della concentrazione del prodotto NO :

$$v_2 = k_2 [\text{NO}]^2$$

Nel tempo, con il procedere della reazione diretta, la v_2 finirà per eguagliare la v_1 e la velocità netta di reazione, sarà uguale a zero.

$$v_1 = v_2$$

$$k_1 [O_2] \cdot [N_2] = k_2 [NO]^2$$

Queste eguaglianze sono considerate valide solo se la reazione è bimolecolare nei due sensi ed avviene in un solo evento. Mantenendo costanti le condizioni (T, V e P) in cui è stato raggiunto l'equilibrio, anche le concentrazioni di O_2 , N_2 , NO_2 rimangono costanti; tuttavia le due reazioni verso destra e verso sinistra non sono ferme, ma procedono con velocità uguali e quindi non sono valutabili misurando la concentrazione dei reagenti o dei prodotti. A questo punto la reazione è in stato di equilibrio. Le molecole dei reagenti e dei prodotti, pur rimanendo costanti in numero, non sono mai le stesse perchè si convertono le une nelle altre continuamente. Perciò si dice che l'equilibrio chimico è dinamico.

La constatazione della dinamicità dell'equilibrio rende evidente che la reazione che raggiunge l'equilibrio (cioè velocità di reazione uguale e zero in presenza di reagenti e prodotti) è reversibile. Infatti è sufficiente aggiungere alla soluzione anche piccole quantità di prodotto per far procedere la reazione in senso inverso al fine di ristabilire lo stato di equilibrio.

Equazione generale della costante di equilibrio.

Le condizioni di equilibrio sono meglio descritte dalla equazione della costante di equilibrio derivata dalle eguaglianze sopra scritte:

$$\frac{[NO]^2}{[O_2] [N_2]} = \frac{k_1}{k_2} = 10^{-30} = K_{eq}$$

K_{eq} = costante di equilibrio.

La K_{eq} risulta uguale a due rapporti di valori, che sono costanti a T costante, e caratterizzano la reazione: quello tra i prodotti delle concentrazioni tra reagenti e prodotti (quando la reazione è all'equilibrio) e quello delle costanti cinetiche.

L'eguaglianza della K_{eq} con il rapporto delle costanti cinetiche è un concetto molto importante utilizzato per elaborare le teorie di cinetica chimica (vedere dopo).

L'eguaglianza si assume valida solo per reazioni bimolecolari che avvengono in un solo evento e che danno due prodotti (nell'esempio le due molecole prodotte sono uguali).

In senso più generale una reazione può essere scritta così:



e l'equazione generale della costante di equilibrio risulta:

$$\frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} = K_{eq}$$

L'equazione è adetta "legge d'azione di massa"

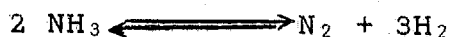
A, B, C, D sono i composti; a, b, c, d sono il numero delle moli dei reagenti e prodotti (cioè le unità stechiometriche) della reazione. Il termine a sinistra è detto quoziente di reazione (Q). Al numeratore è posto il prodotto delle concentrazioni dei prodotti ed al denominatore il prodotto delle concentrazioni dei reagenti. Le concentrazioni compaiono con i rispettivi esponenti. Il L'equazione generale della K_{eq} e quindi il valore della K_{eq} dipendono da come sono scritte le unità stechiometriche dell'equazione della reazione:

$$1) N_2 + 3H_2 \rightleftharpoons 2NH_3 \quad K_{eq1} = \frac{[NH_3]^2}{[N_2][H_2]^3} = 0,67 \cdot 10^6$$

$$2) \frac{1}{2} N_2 + \frac{3}{2} H_2 \rightleftharpoons NH_3 \quad K_{eq2} = \frac{[NH_3]}{[N_2]^{\frac{1}{2}} [H_2]^{\frac{3}{2}}} = 0,82 \cdot 10^3$$

Risulta così che la K_{eq1} è uguale a $[K_{eq2}]^2$ perchè le corrispondenti unità stechiometriche sono il doppio di quelle nell'equazione 2. Il valore assoluto del ΔG°_1 sarà il doppio del ΔG° (vedere dopo).

La K_{eq} della reazione inversa:



è data dal reciproco delle K_{eq} della reazione diretta:

$$\frac{1}{K_{eq1}} = K_{eq} = \frac{[N_2][H_2]^3}{[NH_3]^2}$$

L unità stechiometrica (o unità di reazione) di un dato reagente (es. N_2) in una data reazione (es. $N_2 + H_2$) è il numero di moli del reagente (nel primo esempio 1 mole di N_2 , nel secondo $1/2$ mole di N_2) che nella reazione con uno o più reagenti (nell'esempio H_2) possono reagire totalmente assumendo che la reazione vada a completamento. L'assunzione è teorica, molte reazioni raggiungono l'equilibrio prima che tutte le molecole dei reagenti siano convertite in prodotti. Nel primo esempio, per la completa reazione di 1 mole di N_2 (1 è l'unità stechiometrica di N_2) occorrono 3 moli di H_2 (3 moli è l'unità stechiometrica di H_2), ed in questa proporzione tutto l' N_2 sarà trasformato in 2 moli di NH_3 . Se l'unità di reazione è scritta per $1/2$ mole di N_2 per la sua completa reazione con l' H_2 occorrerà $3/2$ mole di H_2 e verrà prodotta 1 mole di NH_3 . L'equazioni scritte con le unità stechiometriche sono dette bilanciate. Se queste proporzioni dei reagenti non sono rispettate, e cioè non c'è

H_2 a sufficienza per reagire con tutto l' N_2 oppure l' H_2 è in eccesso rispetto al N_2 , non si può parlare di unità stechiometriche né di equazioni bilanciate.

La K_{eq} è indipendente dalla concentrazione iniziale dei reagenti. Una reazione che parta da concentrazioni di reagenti diverse dai valori delle unità stechiometriche, raggiunge egualmente l'equilibrio ma le concentrazioni dei reagenti e prodotti saranno diverse da quelle che la stessa reazione avrebbe avuto partendo dalle concentrazioni uguali ai valori delle unità stechiometriche. Tuttavia, in ambedue i casi, il rapporto dei prodotti delle concentrazioni dei reagenti con il prodotto delle concentrazioni dei prodotti è uguale perché la K_{eq} è una costante della reazione. La K_{eq} è indipendente dalla presenza di catalizzatori, i catalizzatori accelerano il raggiungimento del punto di equilibrio, ma non lo modificano. La K_{eq} dipende solo dalla temperatura. L'aumento della temperatura fa aumentare la velocità della reazione diretta e di quella inversa, tuttavia non proporzionalmente, per cui il rapporto k_1/k_2 e quindi la K_{eq} risultano variati. Il cambiamento del valore della K_{eq} per variazione della T è in relazione alla produzione od assorbimento di calore della reazione. Se la reazione diretta è esotermica, un abbassamento della T esterna favorirà lo spostamento dell'equilibrio verso destra, perché il calore prodotto dalla reazione diretta sarà assorbito in maggior quantità dall'ambiente, mentre un innalzamento della T favorisce la reazione inversa perché l'ambiente potrà cedere più calore e spingerà maggiormente la reazione inversa (la k_2 aumenta più della k_1). L'equilibrio si sposta in modo da opporsi all'effetto dell'aggiunta o rimozione di calore dall'ambiente (incremento o riduzione della T). Questo è un esempio del principio generale detto di Le Chatelier "Se un sistema in equilibrio viene perturbato, l'equilibrio si sposta in modo da opporsi all'effetto che lo perturba tendendo a ristabilire le condizioni originali, sempre che questo spostamento sia possibile". Anche la possibilità di spostare il punto di equilibrio per piccole variazioni della T , come con piccole variazioni della concentrazione dei reagenti e/o prodotti, dimostra la reversibilità della reazione.

Reversibilità e spontaneità delle reazioni.

L'equazione generale della costante di equilibrio è molto importante perché conoscendo il valore della K_{eq} si può stabilire se una certa reazione può procedere spontaneamente in un senso o nell'altro e si possono conoscere in precedenza le concentrazioni dei reagenti e dei prodotti che risulteranno quando la reazione avrà raggiunto l'equilibrio. Se mescolando dei reagenti non vediamo la formazione dei prodotti, conoscendo che il valore della K_{eq} è maggiore di uno, si è orientati a cercare dei catalizzatori per la reazione. La K_{eq} ci dice a quali concentrazioni di reagenti e prodotti si raggiungerà l'equilibrio, ma non in quanto tempo. La K_{eq} , sebbene esprima il rapporto delle costanti cinetiche della reazione, non indica i loro valori assoluti, i quali possono essere

anche molto piccoli.

La reversibilità di una reazione è legata alla richiesta di cambiamenti (di T, P, V e concentrazione) che devono essere molto piccoli per poter alterare lo stato di equilibrio. Al termine reversibilità che caratterizza una reazione all'equilibrio, si oppone il termine spontaneità che indica appunto uno stato fuori dell'equilibrio di una reazione che ha energia libera (capacità di compiere lavoro, vedere dopo) sufficiente per procedere per conto proprio senza altri apporti dal resto dell'universo, ed anche se è richiesto un tempo che può essere infinitamente lungo affinché il processo spontaneo abbia luogo.

Il termine irreversibile si applica a reazioni spontanee che vanno a completamento, cioè in cui si ha la scomparsa dei reagenti; queste reazioni possono essere anche violente come la combustione degli idrocarburi o come le esplosioni. Così la combinazione di $O_2 + H_2$ per formare H_2O è una reazione spontanea estremamente lenta, i due gas possono rimanere insieme per anni senza reagire a T ambiente (circa $20^\circ C$); tuttavia se si applica una fiamma od un catalizzatore al platino si ha una violenta esplosione con la scomparsa dei due gas e la produzione di vapore di H_2O . Così in tutti i casi in cui la reazione non raggiunge un equilibrio, perchè mancando la reazione inversa, la reazione diretta va a completamento (la K_{eq} ha valore infinito), si parla di reazione irreversibile. Infatti piccoli cambiamenti di T, P, V di concentrazione di H_2O non fanno procedere la reazione inversa da $2H_2O$ a $2H_2$ ed O_2 da eguagliare la velocità della reazione diretta.

In teoria, si possono trovare condizioni di T, P, V e concentrazioni dei prodotti da poter far procedere in senso inverso anche reazioni che vanno a completamento come le reazioni violente delle esplosioni, ma dovremmo operare cambiamenti di T, P, V e concentrazione dei prodotti in modo da portarli a valori molto lontani da quelli in cui la reazione diretta procede, per cui non potremo più parlare della reversibilità definita come sopra, cioè operata per piccole variazioni di T, P, ecc.

Tuttavia, anche reazioni spontanee che hanno un naturale punto di equilibrio, quando non hanno ancora raggiunto questo punto sono definite irreversibili. Infatti non essendo ancora all'equilibrio, per poter annullare queste reazioni non sono sufficienti cambiamenti infinitesimali della T, P V o di concentrazione. Se vogliamo far procedere con sintesi netta la reazione in senso inverso, dobbiamo operare considerevoli cambiamenti di T, P, V o di concentrazione dei prodotti e/o reagenti, oppure aspettare che essa raggiunga l'equilibrio.

Quando una reazione bimolecolare ha raggiunto l'equilibrio si può far procedere in un senso o nell'altro variando la concentrazione di un solo prodotto o di un solo reagente. Infatti, viene alterato il quoziente di reazione Q, rispettivamente al numeratore ed al denominatore, ed al fine di mantenere il valore del quoziente uguale alla K_{eq} è necessario che la reazione proceda verso destra se si è aggiunto un reagente e verso sinistra se si è aggiunto un prodotto. Far procedere ulteriormente la reazione diretta aumentando la concentrazione di uno solo dei reagenti può

apparire come un paradosso, tuttavia va tenuto presente che le concentrazioni rappresentano numeri grandi di molecole (soluzione 1M = $6 \cdot 10^{23}$ molecole di soluto) per cui il reagente aggiunto troverà sempre molecole dell'altro reagente con cui reagire. Se invece di uno si varia la concentrazione di ambedue i reagenti la reazione procederà di una quantità maggiore. Nelle cellule, spesso la velocità la velocità delle reazioni bimolecolari, catalizzate da enzimi, è aumentata per incremento della concentrazione di uno solo reagente.

L'irreversibilità di una reazione è legata alla sua spontaneità e cioè al suo stato di non equilibrio.

L'irreversibilità è relativa se la reazione può raggiungere un punto di equilibrio, assoluta se la reazione per la sua natura va a completamento (tutti i reagenti sono trasformati in prodotti).

Tra i due tipi di irreversibilità esiste un'altra differenza: l'irreversibilità di una reazione spontanea fuori dal suo punto di equilibrio, ammette con la reazione diretta, la coesistenza della reazione inversa dal momento in cui si è formata una opportuna concentrazione di prodotti, mentre nelle reazioni che vanno a completamento la reazione inversa non procede mai, altrimenti si raggiungerebbe un punto di equilibrio.

Le cellule utilizzano reazioni che tendono a stati di equilibrio in cui sono presenti sia i reagenti che i prodotti, alcune di esse vengono mantenute costantemente fuori dell'equilibrio, sono cioè mantenute irreversibili da precisi meccanismi di controllo, che regolano la concentrazione e l'attività degli enzimi.

Significato della variazione dell'energia libera nelle reazioni chimiche.

L'energia libera è il potenziale chimico ed il suo valore dà la misura della spontaneità di una reazione (fig. 1-1).

Un sistema chimico ha due tendenze: procede verso lo stato più basso di energia (entalpia) e verso il più grande disordine o probabilità di esistere (entropia).

L'energia libera tiene conto delle due tendenze ed in condizioni di temperatura e pressione costanti è la funzione del potenziale chimico. L'energia libera è una funzione di stato, cioè è determinata dallo stato in cui si trova il sistema in un dato momento, indipendentemente dalla storia pregressa del sistema.

$$G \equiv H - TS$$

G = energia libera

H = entalpia

T = temperatura assoluta

S = entropia

G è funzione di stato come lo sono la pressione, la temperatura, il volume e le altre quantità che vengono definite "proprietà" di una sostanza.

Quando osserviamo un sistema chimico in cui sono presenti più composti che vanno incontro ad una reazione chimica con T e P costanti, si ha una variazione di energia libera che dipende dalle variazioni di entalpia ed entropia.

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S$$

Con T e P costanti in ogni reazione spontanea l'energia libera decresce sempre fino a quando la reazione raggiunge l'equilibrio dove l'energia libera è al suo minimo e la variazione di energia libera è zero (figg. 1-1 e 1-2).

Quindi con i reagenti presenti in una certa concentrazione, la reazione è spontanea da sinistra verso destra ($\Delta G < 0$)

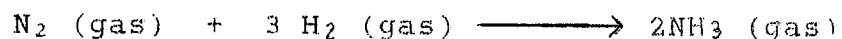


se sono presenti solamente i prodotti la reazione è spontanea verso sinistra ($\Delta G > 0$). All'equilibrio dove reagenti e prodotti sono presenti (in proporzioni diverse a seconda delle reazioni), la reazione non è spontanea in nessun senso perchè il potenziale chimico di quella reazione

è al suo minimo, e solo con l'aggiunta o sottrazione di energia dall'esterno (es. aggiunta o sottrazione di una certa quantità di reagenti o prodotti, variazione della T) si può far procedere la reazione in un senso o nell'altro. All'equilibrio, una certa quantità di reagenti va continuamente incontro alla reazione producendo prodotti, ma non c'è decremento di energia libera, perché simultaneamente una certa quantità di prodotti reagisce riformando una ugual quantità di reagenti, in modo che l'energia libera persa viene compensata e non si ha sintesi netta né di reagenti né di prodotti. Da ciò appare evidente che lo stato di equilibrio dipende dallo stato dell'energia libera, che è il più basso per quelle condizioni, per cui qualsiasi spostamento da tale condizione (far procedere la reazione verso destra o sinistra) richiede apporto di energia libera dall'ambiente. Se non c'è questo apporto la reazione rimane in equilibrio. La reazione all'equilibrio ha costantemente il $\Delta G = 0$. Quindi il valore del ΔG ci dice la distanza dall'equilibrio di una certa reazione, cioè il suo potenziale chimico.

Relazione tra energia libera e concentrazione dei reagenti e dei prodotti.

L'energia libera standard di formazione di un composto può essere calcolata da quella degli elementi nelle loro condizioni standard che sono: gas ad 1 atm di pressione parziale, solidi puri, liquidi puri a 298° Kelvin (25°C), soluti in concentrazioni di 1 mole per litro (1 M). La formazione di NH_3 dai suoi elementi:



ha una variazione di energia libera standard di -7,96 kcal per unità stechiometrica di N_2 (es. 1mole). Questo valore di ΔG° ci dice che la reazione indicata nell'equazione bilanciata è spontanea verso destra. Questo ΔG° è calcolato dai valori di energia libera standard di formazione di N_2 e H_2 che essendo sostanze elementari gassose hanno per convenzione $\Delta G^\circ = 0$ e da quello di NH_3 (gas) che è -3,98 kcal per 1 mole

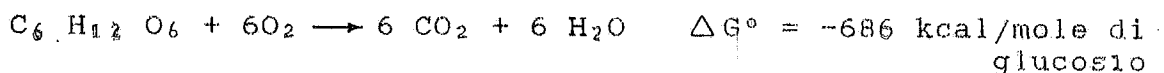
$$2 \text{NH}_3 - \text{N}_2 - 3\text{H}_2 \quad \Delta G = 2(-3,98) - 0(-2 \cdot 0) = -7,96 \text{ kcal}$$

Conoscendo i valori dei ΔG° di formazione di composti si possono calcolare i valori dei ΔG° dei prodotti che si formano da questi stessi composti e così via. Esistono tabelle che danno valori di ΔG° di formazione di elementi e composti (vedere libro n.3). Questi valori di ΔG° sono in relazione allo stato dell'elemento o composto considerato (vedere tab. 1-1). Il ΔG° indica

la spontaneità della reazione i cui reagenti e prodotti sono presenti in condizioni standard.

Valori di $\Delta G^\circ = -50$ kcal indicano reazioni fortemente spontanee che possono procedere con esplosioni. Nelle cellule le singole reazioni hanno valori di ΔG° di circa -10 kcal/mole.

Nelle cellule la combustione del glucosio:



procede attraverso una serie di molte reazioni, ed inoltre più del 40% dell'energia è utilizzata per sintetizzare 38 molecole di ATP per molecola di glucosio e non viene liberata come calore.

La variazione di energia libera di una reazione può essere calcolata anche quando i reagenti ed i prodotti sono in concentrazioni diverse da quelle standard; ciò è particolarmente utile per conoscere il ΔG delle reazioni che avvengono nella cellula dove reagenti e prodotti hanno concentrazioni molto inferiori alla molarità.

La relazione tra ΔG e concentrazione dei reagenti e prodotti della reazione :



è:

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[C]^c \cdot [D]^d}{[A]^a \cdot [B]^b}$$

a,b,c,d sono le unità stechiometriche cioè il numero delle moli dei reagenti e dei prodotti della equazione bilanciata.

$$\frac{[C]^c \cdot [D]^d}{[A]^a \cdot [B]^b} = Q \quad (\text{quoziante di reazione})$$

Il quoziante di reazione è calcolato dai valori delle concentrazioni con le quali si fa partire la reazione. Se la reazione parte dalle condizioni standard, $Q=1$. Infatti la concentrazione dei reagenti e dei prodotti è 1 M e rimarrà 1 anche se elevata a potenza di c,d,a,b; il logaritmo naturale di 1 è zero ed il secondo termine dell'uguaglianza viene annullato:

$$\Delta G = \Delta G^\circ$$

Il ΔG in condizioni standard è detto ΔG° . Il valore del ΔG° di una reazione può essere calcolato da quello della Keq. In condizioni di equilibrio il $\Delta G = 0$ e la formula diviene

$$0 = \Delta G^\circ + RT \ln Q$$

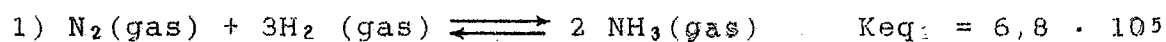
All'equilibrio $Q = Keq$

$$\Delta G^\circ = -RT \ln Keq$$

con $R = 1,987 \cdot 10^{-3}$ kcal/gradi/mole; $T = 298^\circ K$ (equivalente a $25^\circ C$) e moltiplicando $R \times T \times 2,303$ (fattore di conversione dei logaritmi naturali in logaritmi decimali) si ha 1,364 cal/mol (vedere tabella 1-2).

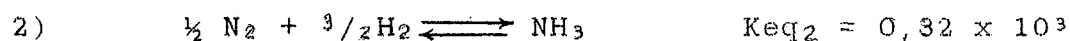
$$\Delta G^\circ = -1,364 \log_{10} x Keq \text{ (espresso in kcal/mole)}$$

Il valore della Keq (vedere pag. 5) e quindi quello del ΔG° dipendono da come è scritta l'unità stechiometrica. Esempio:



$$\begin{aligned} \Delta G^\circ_1 &= -1,364 \log_{10} \cdot Keq = -1,364 \log_{10} 6,8 \times 10^5 = \\ &= 1,364 \times 5,83251 = -7,96 \text{ kcal/mole} \end{aligned}$$

Se l'equazione bilanciata è :



Il ΔG°_2 calcolato dai valori di ΔG° di formazione dei reagenti e dal valore della Keq_2 , risulterà la metà di quello calcolato per l'equazione bilanciata 1).

$$\begin{aligned} \Delta G^\circ_2 &= -1,364 \log_{10} \cdot Keq = -1,364 \log_{10} 0,32 \times 10^3 \\ &= -1,364 \times 2,91381 = -3,97 \text{ Kcal/mole} \end{aligned}$$

Risulta evidente che il valore assoluto (non il segno - o +) del ΔG° e della Keq sono in relazione all'unità stechiometriche prese in considerazione. Considerando l'equazione 1) con $Keq_1 = 6,8 \cdot 10^5$ si ha:

$$\Delta G_1 = -7,96 + 1,364 \log_{10} Q$$

Se $Q = K_{eq}$, il secondo termine è uguale a +7,96, il $\Delta G = 0$ e la reazione è all'equilibrio.

Se $Q < K_{eq}$ il secondo termine risulterà positivo e con valore assoluto inferiore a -7,96 e il $\Delta G < 0$ e la reazione sarà spontanea verso destra.

Se $Q > K_{eq}$ il secondo termine sarà positivo con valore assoluto maggiore di -7,96 e il $\Delta G > 0$ e la reazione sarà spontanea nel senso opposto, verso sinistra.

Dalla formula

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[C]^c \cdot [D]^d}{[A]^a \cdot [B]^b}$$

si vede che il ΔG° indica un valore di spontaneità che può essere incrementata o annullata da opportune variazioni di concentrazione di reagenti e/o prodotti (fig. 1-2). Il ΔG° può essere considerato come indicatore di una spontaneità di "riferimento" della reazione. Si può parlare anche di spontaneità "naturale" se accettiamo che avere i reagenti ed i prodotti in concentrazione 1M rappresenti, oltre che un modo per avere $Q = 1$, una condizione di confronto di contenuto energetico tra reagenti e prodotti.

Prendiamo per esempio una reazione con due reagenti e due prodotti, tutti soluti, che è il caso più comune delle reazioni biologiche. In condizioni standard i due reagenti e i due prodotti sono presenti in concentrazione 1 M; quindi se in queste condizioni il ΔG° è negativo ($\Delta G^\circ < 0$) la reazione procede verso destra, è detta esergonica e la sua spontaneità può essere considerata naturale. Se il ΔG° è positivo ($\Delta G^\circ > 0$) la reazione è spontanea in senso opposto ed è detta endoergonica. Il termine "ergonica" si riferisce alla variazione di energia libera (ΔG) come "termica" alla variazione della sola entalpia (ΔH).

Se il $\Delta G^\circ = 0$ la reazione non ha spontaneità perchè è all'equilibrio nelle condizioni standard.

Il ΔG° si può assumere quindi come indice della spontaneità delle reazioni. Alcune reazioni biologiche, pur avendo spontaneità "naturale" in un senso, nella cellula procedono in senso opposto perchè i reagenti ed i prodotti sono costantemente mantenuti in concentrazioni tali da favorire il continuo rovesciamento della spontaneità "naturale" della reazione (vedere cap. 5).

Alcune considerazioni su entalpia ed entropia delle reazioni chimiche.

$$\Delta G = \Delta H + T\Delta S$$

Come detto in precedenza, l'energia libera è una funzione di stato che ne ingloba altre due: entalpia (H) ed entropia (S). In una trasformazione chimica la variazione di energia libera risulta dalla somma algebrica delle altre due funzioni di stato ed il suo valore ci dice la spontaneità della reazione. Tuttavia per conoscere più intimamente i meccanismi di una reazione chimica è opportuno analizzare

distintamente il significato dell'entalpia ed entropia, perchè in alcune reazioni entalpia ed entropia spingono la reazione in direzioni opposte. Nella maggior parte delle reazioni, la forza che spinge le reazioni è la liberazione di calore (decremento di entalpia) per cui ΔG e ΔH hanno lo stesso segno e valori molto vicini perchè il ΔS è molto piccolo. Tuttavia esistono reazioni in cui la liberazione di calore è accompagnata da diminuzione di entropia, così il decremento di entalpia favorisce la reazione diretta e l'aumento di entropia quella inversa. In altre reazioni si ha che l'aumento di entropia domina sul decremento di entalpia, per cui il ΔG è negativo ed il ΔH positivo. Questa situazione si ha in reazioni con almeno un reagente solido e prodotti gassosi. In genere, a basse T prevale il ΔH come forza propulsiva, mentre al alte T prevale il ΔS . Nelle reazioni in cui, ΔH e ΔS operano in opposizione, variando la T si può far procedere le reazioni nei due sensi.

Significato di entalpia.

Il primo principio della termodinamica dice che l'energia contenuta in un sistema non è né creata né distrutta. L'energia del sistema non è necessariamente costante, perchè essa aumenta o decresce se rispettivamente aggiungiamo o sottraiamo calore dal sistema ed egualmente se facciamo un lavoro sul sistema o facciamo fare un lavoro dal sistema. Così la variazione dell' energia del sistema risulta dalla differenza del calore netto e del lavoro netto scambiati con l'ambiente:

$$\Delta E = q - w$$

E = energia (energia interna del sistema)

q = calore netto (calore scambiato dal sistema con l'ambiente; variazioni del movimento e/o vibrazioni delle molecole del sistema operato dall'ambiente).

w = lavoro netto (fatto dal sistema sull'ambiente e dall'ambiente sul sistema)

La formula sopra indicata definisce in modo quantitativo la prima legge della termodinamica.

Il calore ed il lavoro non sono funzioni di stato ma lo è la loro differenza, che è la misura dell'energia del sistema. Infatti, se viene scaldato un gas e poi a questo gas viene fatto svolgere un lavoro che utilizzi tutto od in parte il calore fornito, al termine degli scambi nessuna misura fatta sul gas ci può dire quanto calore è stato somministrato e quanto di questo calore è stato convertito in lavoro. Salvo aver preso, se possibile, la misura di tutto il lavoro fatto dal e sul sistema e del calore scambiato tra sistema ed ambiente. Cioè, aver registrato la storia degli scambi, ma ciò non fa parte delle caratteristiche della funzione di stato. La funzione di stato è indipendente dalla storia pregressa degli scambi di lavoro e calore avuti dal sistema, ma è una misura dello stato del sistema in quel determinato momento in cui lo osserviamo. Infatti, se dopo una serie di scambi di calore e lavoro la differenza (q - w) risulta

variata, vuol dire che c'è stata una variazione di energia del sistema che risulterà misurabile in una o più proprietà del gas: Temperatura, densità, volume molare ecc.

La conservazione dell'energia nelle reazioni chimiche.

Lo studio del calore di reazione può essere fatto convenientemente a volume costante, perchè si evita l'esecuzione di lavoro da aumenti di volume in conseguenza di incrementi di pressione (lavoro PV). Così tutto il calore liberato dalla reazione (se non sono fatti altri tipi di lavoro) è misurabile come variazione della temperatura ed il calore liberato dalla reazione è uguale al decremento dell'energia interna del sistema

$$\Delta E = q_v \quad (v \text{ indica il volume costante})$$

Lo strumento per misurare il calore liberato da reazioni di combustione che svolgono calore senza eseguire lavoro è la bomba calorimetrica. Essa è costituita da un recipiente di metallo molto solido, provvisto di un sistema (in genere una resistenza elettrica) per far iniziare la combustione che avviene con la sostanza accuratamente pesata e l'ossigeno messo nella bomba. La bomba è messa in una vasca contenente acqua, così il calore liberato dalla reazione scalda le pareti della bomba e questa l'acqua. Misurando la temperatura dell'acqua si ha la misura del calore liberato dalla reazione.

Le reazioni che liberano calore sono dette esotermiche, quelle che lo assumono endotermiche.

Molte reazioni procedono a P costante e la funzione di stato che misura il calore di reazione a pressione costante è l'entalpia.

$$\Delta H = \Delta E + P \cdot \Delta V$$

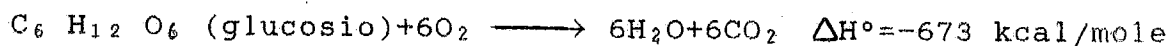
quindi

$$H = q - w + P \cdot \Delta V$$

Se si esclude qualsiasi lavoro incluso quello di PV

$$\Delta H = q_p \quad (\text{a } P \text{ costante})$$

A pressione costante l'entalpia decresce nelle reazioni esotermiche e aumenta nelle reazioni endotermiche. L'entalpia è una funzione di stato, e il cambiamento di entalpia in un sistema dipende dall'entalpia del sistema prima o dopo la trasformazione (che ha causato il cambiamento di entalpia nel sistema) ed è indipendente dal percorso della trasformazione stessa. Analogamente il calore di reazione è la differenza dell'entalpia dei reagenti e quella dei prodotti, indipendentemente dal fatto che la reazione avvenga in uno o più passaggi, ed inoltre in una serie di reazioni in cui i prodotti dell'una sono reagenti dell'altra, l'entalpia della trasformazione dei primi reagenti nei prodotti finali è data dalla somma algebrica delle entalpie delle singole reazioni. Ad esempio :



Un modo per calcolare teoricamente l'entalpia di una molecola è quello di sommare i valori di entalpia dei legami che tengono uniti gli atomi delle molecole. Sono state fatte tabelle che danno i valori medi di entalpia dei vari tipi di legami covalenti (es. C-C). Tuttavia per alcune classi di molecole come gli idrocarburi aromatici, questo metodo dà dei risultati molto diversi da quelli ottenuti con la misura del calore di combustione.

Significato di entropia.

Un oggetto può possedere energia cinetica se è in movimento, o potenziale, se fermo in un punto dello spazio, è soggetto al campo gravitazionale. Nel capitolo precedente abbiamo visto che le sostanze posseggono energia nei legami che uniscono gli atomi delle loro rispettive molecole, e che l'energia è liberata dai legami nelle trasformazioni chimiche a cui partecipano le molecole. Le sostanze posseggono un'altra forma di energia che nelle sostanze solide è data dalla vibrazione degli atomi e molecole, e nei fluidi anche dal movimento delle molecole nelle diverse direzioni dello spazio. L'insieme dei movimenti e vibrazioni delle molecole e degli atomi è definito calore ed è misurato dalla temperatura della sostanza.

La quantità di calore necessaria per innalzare di 1 caloria una mole di sostanza è detta capacità termica espressa in:

$$\text{cal} \cdot \text{gradi}^{-1} \cdot \text{mole}^{-1}$$

Nel capitolo precedente abbiamo visto che il contenuto energetico di un sistema è la differenza tra calore e lavoro:

$$\Delta E = q - w$$

La variazione di energia interna di un sistema risulta dal lavoro fatto sul sistema dall'ambiente e dall'aumento di movimento casuale delle molecole del sistema stesso. E' sempre possibile trasformare il lavoro in incremento di agitazione molecolare, cioè in calore, mentre esistono limiti per la trasformazione del calore in lavoro. Questi limiti sono espressi dalla seconda legge della termodinamica espressa da W. Thompson: "non si può convertire una certa quantità di calore in lavoro senza perdere una parte di questo stesso calore ad una temperatura più bassa", o nella versione di R. Clausius: "non si può trasferire calore da un oggetto freddo ad uno più caldo senza fare del lavoro per rendere possibile questo trasferimento".

L'esempio più semplice è dato da un oggetto in movimento che si arresta strisciando su una superficie: l'energia cinetica è trasformata in calore, cioè in un aumento delle vibrazioni delle molecole dell'oggetto e della superficie a causa della frizione esistente tra loro. Questo processo non è completamente reversibile, il movimento disordinato delle molecole e/o le vibrazioni degli atomi non possono essere

convertiti con una efficienza del 100% nel movimento di tutte le molecole in una unica direzione (cioè nell'originale movimento dell'oggetto prima che questo incontrasse la superficie). In teoria il calore prodotto potrebbe essere raccolto ed utilizzato per far scaldare acqua, la quale potrebbe far muovere una macchina a vapore costruita in modo da rimettere in movimento l'oggetto; tuttavia l'oggetto non riacquisterebbe la velocità originale. Le esperienze di questo tipo di irreversibilità hanno portato alla formulazione del secondo principio della termodinamica.

La formulazione del secondo principio della termodinamica ha richiesto la definizione di una nuova funzione di stato: l'entropia (S) del sistema.

L'entropia può essere definita così: se alla temperatura T una quantità di calore (q) è aggiunta al sistema in maniera reversibile, l'entropia del sistema aumenta di:

$$S = \frac{q}{T}$$

Questo incremento di entropia rappresenta l'incremento minimo possibile per quel trasferimento di calore perché effettuato in maniera reversibile; cioè il corpo donatore e quello accettore di calore devono essere in equilibrio termico. Ciò non risulta nei trasferimenti reali di calore (es. scaldare l'acqua per il caffè) che sono irreversibili, perché avvengono tra corpi non in equilibrio termico. Nei processi reali la variazione di entropia è maggiore di q/T

$$S > \frac{q}{T}$$

L'entropia definita come q/T non è collegata direttamente con la natura molecolare degli oggetti. La relazione tra entropia e natura molecolare delle sostanze è data dall'equazione di Boltzmann.

$$\Delta S = K_B \ln W$$

$$\Delta S = 2,303 \cdot K_B \log_{10} W$$

K_B = (costante di Boltzmann) = R/N

R = costante dei gas

N = numero di Avogadro

W = numero dei modi equivalenti in cui può esistere uno stato del sistema

La formula di Boltzmann ci dice che l'entropia di un sistema

chimico è la misura del disordine del sistema. Infatti maggiore è il numero di modi in cui si possono disporre le molecole nello spazio e maggiore sarà il valore di S di quel sistema. 1 mole di sostanza gassosa avrà un valore di S maggiore di quello di 1 mole della stessa sostanza allo stato solido perchè le molecole di un gas possono disporsi in un dato spazio con un numero grande di disposizioni, mentre lo stesso numero di molecole allo stato solido ha una unica disposizione. Infatti, le molecole delle sostanze solide non possono spostarsi, l'una rispetto all'altra, anche se i loro atomi possono avere dei piccoli spostamenti (vibrazioni). Se la sostanza solida viene sciolta in acqua, la sua entropia aumenta perchè aumenta il disordine, cioè il numero di disposizioni equivalenti (delle molecole della sostanza) in cui può esistere la sostanza nel nuovo stato (soluzione). Al contrario, se un gas viene sciolto in un liquido, ha un decremento di S perchè le sue molecole, a causa delle molecole del liquido con cui sono mescolate, hanno una riduzione delle loro disposizioni possibili. Un sistema quindi ha un macrostato che è misurabile con P , V , T che risulta dalle disposizioni del microstato. Il microstato sono le disposizioni che possono assumere le molecole. Il valore di W è il numero di microstati (diversi tra loro) che producono lo stesso macrostato. Un gas con P , V e T costanti che caratterizzano il suo macrostato risulta da un numero grandissimo di disposizioni (W) che le sue molecole (microstato) assumono casualmente per la loro agitazione a quella temperatura. Se viene aumentato il volume a disposizione di questo gas le molecole tenderanno spontaneamente ad occupare il nuovo spazio messo a loro disposizione perchè così facendo potranno avere un numero maggiore di disposizioni e quindi saranno in uno stato più disordinato di quello precedente. Maggiori sono le disposizioni possibili del microstato che produce lo stesso macrostato e maggiore è il disordine del macrostato, maggiore è la probabilità di trovare in natura quel macrostato. Nessuno si meraviglia se vede diffondere un gas da un recipiente che lo contiene verso un altro recipiente vuoto in comunicazione con il primo, e se per portare il gas ad occupare il recipiente iniziale dobbiamo compiere un lavoro.

Esistono tabelle in cui vengono dati i valori di entropia standard (ΔS) delle sostanze, questi valori sono stati calcolati dai valori della capacità termica, calore di fusione e calore di vaporizzazione. I valori di ΔS così ottenuti danno il collegamento tra l'entropia termica:

$$\Delta S = \frac{q}{T}$$

e quella statistica: $\Delta S = 2,303 \cdot K \log_{10} W$

e portano alla formulazione della III legge della termodinamica: " l'entropia di un cristallo perfetto, a zero gradi assoluti, è zero".

In un cristallo perfetto, alla temperatura di zero gradi assoluti, il contenuto calorico del cristallo è zero, per

cui le molecole e gli atomi che formano il cristallo non hanno nessun movimento o vibrazione e quindi fanno una sola disposizione. Se $W = 1$ il suo logaritmo rende la S calcolata con la formula di Boltzman uguale a zero.

La conoscenza dell'entropia permette di spiegare la spontaneità di quelle trasformazioni che avvengono con assorbimenti di calore, cioè con un ΔH positivo. In genere le trasformazioni spontanee procedono con liberazione di energia (decremento di entalpia), tuttavia esistono eccezioni:



$$H_{298}^\circ = + 3,62 \text{ kcal/mole}$$

Queste trasformazioni avvengono spontaneamente pur assorbendo calore dall'ambiente perchè i loro prodotti sono più disordinati dei reagenti.

Esistono altri esempi di trasformazioni spontanee che procedono con incremento di entalpia, spinte da un incremento di entropia. Quindi nè il decremento di entalpia, nè l'aumento di entropia del sistema presi da soli sono indici di spontaneità validi per tutte le trasformazioni. Nel paragrafo precedente (pag. 9) abbiamo mostrato che il vero indice di spontaneità è il decremento di energia libera (ΔG), funzione di stato del sistema che ingloba entalpia ed entropia.

Proprietà dell'equilibrio chimico.

Sommario:

1- Le reazioni chimiche tendono spontaneamente all'equilibrio. Le forze che spingono le reazioni sono: il decremento di contenuto calorico, entalpia, (ΔH) e l'incremento di disordine (maggiore possibilità di disposizioni nello spazio delle molecole dei reagenti rispetto ai prodotti della reazione) entropia, (ΔS).

2- La misura della spontaneità di una reazione è data dalla variazione di energia libera (ΔG). Funzione di stato che include le altre due funzioni di stato: entalpia (H) ed entropia (S). Esistono reazioni in cui H ed S si antagonizzano, per cui presi singolarmente ΔH e ΔS non possono dare la misura della spontaneità che invece è data dal ΔG . Il segno negativo del ΔG indica la spontaneità della reazione da sinistra verso destra come scritta nell'equazione di reazione nelle condizioni in cui avviene (concentrazioni dei reagenti e prodotti e T); il segno positivo indica la spontaneità nel senso opposto. Il valore assoluto del ΔG indica la distanza dall'equilibrio della reazione perchè all'equilibrio il ΔG è zero.

3- A temperatura costante il punto di equilibrio è costante, cioè indipendente dalle concentrazioni che reagenti e prodotti avevano all'inizio della reazione. Il punto di equilibrio è caratterizzato da un unico valore di Q (quoziente di reazione) e quindi K_{eq} e da un unico valore di ΔG° . K_{eq} e ΔG° sono in relazione, conoscendo il valore di una si può calcolare l'altro e viceversa.

$$\Delta G^\circ = - RT \log_n \cdot K_{eq}$$

La K_{eq} ha anche il valore del rapporto tra k_1 e k_2 , costanti cinetiche rispettivamente della reazione diretta ed inversa.

4- La temperatura influenza il punto di equilibrio di una reazione e quindi la K_{eq} ed il ΔG° . L'aumento di temperatura si oppone alle reazioni esotermiche (che procedono liberando calore) e favorisce le endotermiche; l'abbassamento della temperatura ha effetti rispettivamente opposti.

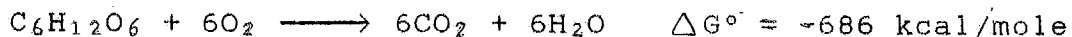
5- Il ΔG° e la K_{eq} indicano la spontaneità della reazione partendo dalle condizioni standard ed i loro valori sono presi come riferimento della spontaneità della reazione.

6- I valori del ΔG° e del ΔG non includono il tempo necessario alla reazione per raggiungere l'equilibrio. Il tempo può essere pochi secondi o milioni di anni e non è in relazione al valore del ΔG° o del ΔG .

7- L'equilibrio chimico è dinamico. All'equilibrio per ogni reazione che procede liberando energia libera ne avviene un'altra in senso opposto che assume energia libera e viceversa, in modo che la variazione di energia libera rimane costantemente uguale a zero. L'analisi delle proprietà dell'equilibrio chimico rende evidente che nelle trasformazioni chimiche si ha conservazione della massa e dell'energia.

Cinetica chimica

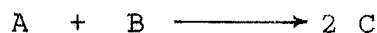
Si conoscono reazioni che sono altamente "spontanee" (es. ossidazione del glucosio con produzione di acqua ed anidride carbonica)



ma che senza catalizzatori richiedono un tempo infinitamente lungo per avvenire. Si definisce quindi il glucosio come un composto inerte verso l' O_2 perchè reagisce con questo molto lentamente, anche se in presenza di O_2 , il glucosio è termodinamicamente instabile perchè glucosio ed O_2 sono reagenti di una reazione spontanea molto lontana dall'equilibrio. Vedremo che nel metabolismo cellulare la quasi totalità delle molecole biologiche sono inerti pur essendo instabili, cioè reagenti di reazioni spontanee nelle condizioni cellulari. Questa inerzia associata alla spontaneità, spiega la funzione dei catalizzatori biologici (enzimi) e della loro regolabilità. Infatti regolando l'attività catalitica degli enzimi, si regola la velocità delle reazioni spontanee da loro catalizzate da zero a valori di 10.000 reazioni al secondo per ogni molecola di enzima. Del resto, due composti che siano molto reattivi tra loro e termodinamicamente instabili, esistono come tali per tempi brevi perchè appena messi a contatto reagiscono e spontaneamente vengono trasformati in composti più stabili. La cinetica chimica studia la velocità delle reazioni ed in definitiva le barriere che si oppongono allo svolgimento delle reazioni stesse. Queste barriere (energia libera di attivazione) sono energetiche ed entropiche. Il loro studio è reso difficile dal fatto che si è costretti a lavorare con molte molecole di ogni singola specie di reagente, le quali hanno livelli di energia ed orientamenti nello spazio diversi, per cui è difficile definire quali livelli energetici ed entropici limitino la velocità di reazione. Tuttavia sono state elaborate due teorie rispettivamente dette della collisione e della velocità assoluta, che combinate permettono di spiegare le velocità di reazioni bimolecolari semplici, cioè reazioni che avvengono tra due molecole in un unico evento, con formazione di due molecole di prodotti. Si assume che queste due teorie abbiano un significato generale anche se i dettagli di reazioni più complesse devono essere ancora definiti.

Misura della velocità di reazione.

La velocità di reazione è misurata osservando la scomparsa di un reagente o la formazione di un prodotto. Nella reazione:



la velocità di scomparsa di A nell'unità di tempo è:

$$-\frac{d[\text{A}]}{dt} = -\frac{d[\text{B}]}{dt} = \frac{1}{2} \frac{d[\text{C}]}{dt}$$

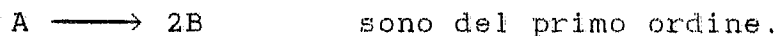
il segno negativo è per i reagenti (perché scompaiono) e quello positivo per i prodotti (perché si formano). La velocità di formazione di C è divisa per 2 perché con la scomparsa di 1A si ha la formazione di 2C. La velocità di formazione di C nell'unità di tempo è:

$$\frac{d[C]}{dt} \text{ da cui si ottiene che } \frac{d[C]}{dt} = -2 \frac{d[A]}{dt} = -2 \frac{d[B]}{dt}$$

La velocità della reazione è proporzionale al prodotto delle concentrazioni dei reagenti e dipende dall'esponente (nel caso di A e di B è uno) di ciascuna delle concentrazioni:

$$\frac{d[C]}{dt} = k [A] [B] \quad \text{equazione della velocità}$$

L'ordine di reazione è dato dalla somma degli esponenti delle concentrazioni nell'equazione della velocità. Nell'esempio la reazione per la formazione di C è del primo ordine per la concentrazione di ciascun reagente (A e B) e del secondo ordine in totale. Le reazioni di decomposizione spontanea di un composto, es.:



Esistono reazioni che sono indipendenti dalla concentrazione dei reagenti ed hanno quindi ordine zero. Tuttavia l'ordine di reazione non dà indicazioni sul meccanismo di reazione né sul valore assoluto della velocità di reazione. Infatti esistono reazioni che sulla base delle unità stechiometriche dovrebbero essere dell'11° ordine ma sperimentalmente risultano del 2°.

La molecolarità di reazioni che avvengono in un solo evento è data dal numero di singole specie molecolari che partecipano alla reazione.

Molte reazioni che avvengono in un solo evento sono o monomolecolari (come il decadimento del C_{14}) o bimolecolari (esempio pag. 21), vere reazioni trimolecolari sono rare. Per stabilire la molecolarità bisogna conoscere il meccanismo di reazione, perché alcune reazioni apparentemente bimolecolari, cioè tra due reagenti, avvengono attraverso una serie di reazioni, ognuna con propria molecolarità.

Velocità delle reazioni, collisioni tra molecole ed energia di attivazione.

La velocità delle reazioni è limitata da una barriera energetica che deve essere superata affinché le molecole che si incontrano possano reagire invece che rimbalzare immutate.

La presenza della barriera energetica è basata sulla interpretazione data da Arrhenius sulla dipendenza della

costante di velocità (k) della reazione dalla temperatura (T).

Se viene costruito un grafico (fig. 1-3) del $\log k$ in funzione dell'inverso della temperatura assoluta $1/T$, si ha una linea retta la cui pendenza è data da E_a/R dove R = costante dei gas ed E_a è la barriera energetica alla reazione ed è detta "energia di attivazione" di Arrhenius, una costante non dipendente da T. La dipendenza del valore della k cinetica della reazione dalla T è espressa dall'equazione:

$$(1) \quad \frac{d \ln K}{d\left(\frac{1}{T}\right)} = - \frac{E_a}{R}$$

L'equazione è derivata da quella della dipendenza della K_{eq} dalla temperatura

$$(2) \quad \frac{d \ln K_{eq}}{dT} = \frac{\Delta H^\circ}{RT^2}$$

Sostituendo il valore di K_{eq} con quello k_1/k_2 e quindi risolvendo per una delle costanti cinetiche si ha l'equazione generale:

$$(3) \quad \frac{d \ln K}{dt} = \frac{E_a}{RT^2}$$

e da questa è stata ricavata l'equazione sopra indicata (1). Le equazioni 1 e 3 sono dette equazioni della velocità di reazione di Arrhenius.

La sostituzione della K_{eq} con k_1/k_2 limita la validità dell'interpretazione di Arrhenius alle sole reazioni bimolecolari che avvengono in un unico passaggio.

Tuttavia il fatto che la costante cinetica dipenda dalla T avvalorà il concetto che esista una energia soglia che deve essere superata affinché avvenga la reazione. Infatti il valore dell'energia di attivazione rimane costante al variare della T e quindi indipendente dalla essa, e da ciò risulta evidente come aumentando la temperatura aumenti la velocità di reazione per aumento delle costanti cinetiche, infatti, mentre il valore dell'energia di attivazione rimane costante, l'energia cinetica delle molecole dei reagenti aumenta.

Con il crescere della temperatura ci saranno più probabilità che gli urti tra le molecole avvengano con energia sufficiente a superare la barriera alla reazione costituita dall'energia di attivazione E_a . Ciò risulta in una regola (approssimativa) detta di Van't Hoff che stabilisce che la velocità di reazione raddoppia con l'aumento di 10°C della temperatura. Quando la reazione diretta è esotermica, l'energia di attivazione della reazione inversa è maggiore di quella della reazione diretta perchè i prodotti di reazione, per tornare a formare i reagenti, devono acquisire un'energia almeno uguale al valore della somma dell'energia di attivazione della reazione diretta e dell'energia (entalpia) liberata con la reazione (vedere fig. 1-4). La figura 1-4 rende evidente che il punto di equilibrio non può dipendere dai valori dell'energia di attivazione della reazione diretta o di quella inversa ma dalla loro differenza che è il valore del ΔH° di reazione. I concetti sopra espressi, nati dall'aver individuato una barriera energetica alla reazione, hanno portato alla formulazione di due teorie sulla cinetica delle reazioni bimolecolari dette della collisione e della velocità assoluta.

La teoria della collisione è basata sulla considerazione delle caratteristiche delle collisioni tra le molecole dei reagenti: frequenza degli urti tra le molecole e quantità degli urti capaci di conferire alle due molecole una energia superiore a quella dell'energia di attivazione di Arrhenius (E_a).

La teoria della velocità assoluta è basata sulle caratteristiche del complesso di attivazione (concentrazione, velocità di decomposizione, sua probabilità di evolvere in prodotti).

Ambedue le teorie osservano gli eventi che precedono la formazione dei prodotti che rappresentano la barriera alla reazione. La teoria della collisione è diretta alla valutazione dell'energia necessaria a superare la barriera e la teoria della velocità assoluta è diretta alla valutazione della concentrazione del complesso attivato ed in sostanza sulla velocità della sua formazione.

Teoria della collisione.

La teoria della collisione è costruita prendendo in considerazione reazioni bimolecolari semplici che avvengono tra gas e poi estendendo tale teoria ad altri tipi di reazione.

Nella teoria della collisione la reazione procede quando le molecole si incontrano con una energia superiore ad E_a di Arrhenius. Quindi è necessario conoscere 1) il numero degli urti che avvengono tra le molecole dei reagenti, e 2) quanti di questi urti danno alle molecole l'energia sufficiente a superare l' E_a .

La frequenza delle collisioni dipende dalla concentrazione delle molecole dei reagenti, dal loro peso molecolare, dalla temperatura che fa muovere più velocemente le molecole e quindi incrementa la frequenza degli urti.

La frequenza delle collisioni risulta uguale al prodotto:

$$1) \quad Z \cdot [A] \cdot [B]$$

[A] e [B] sono le concentrazioni dei due reagenti.
Z sarebbe la costante cinetica della reazione se E_a fosse uguale a zero. In questo caso si dice che la velocità di reazione è controllata dalla diffusione. Essa rappresenta il limite superiore della velocità di reazione, perchè mancando l'energia di attivazione, le molecole dei reagenti quando si incontrano reagiscono sempre.
Z può essere calcolato dai diametri e pesi molecolari delle molecole reagenti considerate come sfere.

Tra tutte le coppie di molecole che si incontrano (la cui quantità è espressa in 1) la frazione che raggiunge un valore di energia (E) uguale o superiore all' E_a è data da:

$$2) \quad e^{-(E_a/RT)}$$

La velocità di reazione : $\left(- \frac{d[A]}{dt} \right)$

risulterà:

dal prodotto della frequenza delle collisioni ($Z[A][B]$) per il valore della frazione di coppie dei reagenti che incontrandosi hanno raggiunto un'energia ($e^{-(E_a/RT)}$) $\geq E_a$.

$$3) \quad - \frac{d[A]}{dt} = Z \cdot e^{-(E_a/RT)} \cdot [A][B] \quad \text{(equazione della velocità di reazione)}$$

Da questa equazione si può ricavare la costante cinetica delle reazioni bimolecolari:

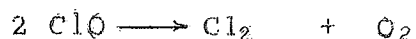
$$4) \quad k = Ze^{-(E_a/RT)} \quad \text{(equazione della costante cinetica di reazione)}$$

Le equazioni in 3 e 4 indicano che sia la velocità che la costante cinetica della reazione aumentano con l'aumentare della T. Ciò è spiegato considerando che con l'aumento della T, le collisioni tra molecole di reagenti sono più frequenti (vedi 1) ed è maggiore la probabilità che le molecole che si incontrano abbiano $E \geq E_a$; mentre E_a non è in funzione di T. Il grafico in fig. 1-3 mostra che il rapporto ($\ln k$ su $1/T$) è costante, cioè se aumenta T aumenta anche k, da ciò si assume che E_a rimanga costante.

Alcune considerazioni sulla teoria della collisione.

Nelle reazioni bimolecolari semplici, l'energia di attivazione di Arrhenius (E_a) è circa il 30% della somma dell'energia dei legami che vengono spezzati; se nella reazione bimolecolare il legame rotto è uno solo, l'energia di attivazione è circa l'8% dell'energia del legame che si è rotto.

Questa relazione, sebbene imprecisa, suggerisce che in genere l' E_a non corrisponde alla somma dell'energia dei legami che si devono spezzare perchè avvenga la reazione. Questa mancata corrispondenza può essere anche molto grande. Nella reazione:



L'energia del legame tra Cl ed O è 64,5 kcal/mole

L'energia richiesta per spezzare i legami delle due molecole di ClO è 129,0 kcal/mole.

Quindi E_a dovrebbe essere circa 129 Kcal/mole di coppie di molecole ClO che collidono mentre in realtà è zero.

Quindi si deve dedurre che lo stato attivato dalle due molecole reagenti non si realizza attraverso una fase in cui tutti e quattro gli atomi (2Cl e 2O) sono completamente separati e poi casualmente si riassociano in maniera diversa da come erano nei reagenti (nell'esempio da ClO a Cl₂ e O₂). Bisogna quindi assumere che lo stato attivato si identifichi in un complesso intermedio formato dai quattro atomi delle due molecole reagenti e dove gli atomi sono disposti in modo che la instabilità creata dalla labilizzazione dei legami Cl-O sia compensata in ogni momento dalla formazione di legami Cl-Cl e O-O (fig. 1-5). Mentre il legame tra Cl-O si indebolisce, i legami rispettivamente tra O-O e Cl-Cl si cominciano a formare, per cui l'energia liberata dai legami che si vanno formando per dare i prodotti (O₂ e Cl₂) va a compensare l'energia richiesta per labilizzare i legami del reagente (2ClO); così mentre il legame Cl-O tende ad allungarsi, quelli ancora labili tra i due O e i due Cl tendono ad accorciarsi.

Questo complesso intermedio che è l'aspetto molecolare dello stato attivato, è anche detto complesso attivato ed ha le caratteristiche di una molecola instabile che può ritornare a dare reagenti o formare prodotti. Il complesso intermedio ha un livello energetico superiore a quello dei reagenti e prodotti, e si assume che esso abbia il livello energetico più basso di qualsiasi altro intermedio che si forma nello stato attivato, per cui rappresenta il passaggio obbligato della reazione.

Sebbene la reazione 2 ClO con $E_a = 0$ sia un caso particolare, la regola empirica che l' E_a è circa il 30% della somma delle energie dei legami tra gli atomi che dovranno reagire, ci dice che la formazione di un complesso attivato con caratteristiche simili a quelle indicate sopra ed in fig. 1-5, è un passaggio obbligato di molte reazioni bimolecolari. La deduzione che durante la reazione si formi un complesso intermedio attivato suggerisce che le molecole che interagiscono tra loro possano avere energie diverse in

relazione alle loro disposizioni relative nello spazio e non solo in relazione all'energia cinetica posseduta dalle stesse molecole. L'importanza della formazione del complesso attivato, secondo una precisa disposizione degli atomi delle molecole che devono reagire, viene discussa nella teoria della velocità assoluta, detta anche dello stato di transizione.

Poichè nella teoria della collisione la formula della velocità e delle costanti cinetiche della reazione includono il valore di E_a , la mancata corrispondenza tra E_a e l'energia dei legami che si spezzano nella reazione, ed in particolare il valore nullo di E_a nella reazione del ClO con se stesso, suggerisce che la teoria della collisione possa fornire valori non sempre vicini a quelli reali.

I valori della costante cinetica della reazione del ClO calcolato con la teoria della collisione, risulta 400 volte maggiore rispetto al valore della stessa costante ottenuto sperimentalmente, mentre la costante cinetica della stessa reazione calcolata secondo la teoria della velocità assoluta, ha un valore che differisce di circa 9 volte da quello della costante cinetica ottenuta da dati sperimentali. In genere, la teoria della velocità assoluta da valori più vicini alla realtà di quanto non faccia la teoria della collisione.

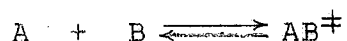
Teoria della velocità assoluta o dello stato di transizione.

La teoria ammette la formazione di un complesso intermedio instabile che è detto di transizione, essendo un passaggio obbligato della reazione.

Secondo questa teoria la reazione avviene quando il complesso attivato si scinde per dare i prodotti di reazione, per cui la velocità della reazione dipende

1) dalla concentrazione del complesso attivato, 2) dalla velocità della decomposizione dei singoli complessi attivati nei due sensi della reazione (cioè il grado di instabilità del complesso), 3) dalla probabilità che il complesso formi prodotti (e non nuovamente i reagenti).

La teoria ammette un equilibrio tra reagenti e complesso attivato:



A e B = reagenti

AB^\ddagger = complesso attivato

K^\ddagger = costante di equilibrio della reazione di formazione del complesso attivato

$$\frac{[AB^\ddagger]}{[A][B]} = K^\ddagger$$

$[A][B] \cdot K^\ddagger = [AB^\ddagger]$ concentrazione del complesso attivato.

La velocità di decomposizione del complesso attivato, con T costante, ha un valore costante ed uguale per tutte le reazioni bimolecolari ed è uguale a:

$$2) \quad \frac{K_b T}{h} = \text{velocità di decomposizione del complesso attivato (nei due sensi)}$$

K_b = costante di Boltzmann

h = costante di Planck

T = temperatura assoluta

La probabilità che il complesso attivato evolva in prodotti e non in reagenti è detta coefficiente di trasmissione (K_t). In molte reazioni, il valore di k_t è stimato tra 0,5 e 1.

$$3) \quad K_t = 0,5 \pm 1$$

Dai punti 1,2,3 risulta:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k_t \cdot \frac{K_b \cdot T}{h} K^\ddagger [A][B] \quad (\text{equazione della velocità di reazione})$$

Dall' equazione della velocità di reazione viene ricavata:

$$k_{rb} = k_t \frac{K_b T}{h} K^\ddagger \quad (\text{equazione della costante cinetica della reazione bimolecolare } k_{rb})$$

La K può essere calcolata mediante l'uso della meccanica statistica, quindi utilizzando le relazioni:

$$-RT \ln K^\ddagger = \Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \Delta S^\ddagger$$

Si può riscrivere l'equazione della costante cinetica delle reazioni

$$k_{rb} = K_t \frac{K_b T}{h} \cdot e^{-(\Delta G^\ddagger / RT)}$$

$$k_{rb} = K_t \frac{K_b T}{h} e^{+(\Delta S^\ddagger / R)} \cdot e^{-(\Delta H^\ddagger / RT)}$$

La costante cinetica delle reazioni bimolecolari è in relazione alla variazione di entalpia (ΔH^\ddagger) e di entropia (ΔS^\ddagger) della reazione di formazione del complesso attivato.

La teoria della velocità assoluta, considerando il complesso attivato come una forma molecolare specifica (cioè diversa dalla molecole dei reagenti e prodotti), anche se instabile perchè ad un livello energetico maggiore di quello dei reagenti e prodotti, pone in relazione l'energia libera di formazione del complesso attivato (ΔG^\ddagger) con la velocità di reazione.

La teoria della velocità assoluta considera che la velocità di reazione non sia solo dipendente dall'energia che possiede il complesso attivato, ma anche dalla struttura del complesso, e cioè dalla disposizione che le molecole dei reagenti devono assumere al momento del loro incontro al fine di formare il complesso attivato. Questa teoria quindi tiene anche conto dello stato di ordine del complesso attivato rispetto a quello dei reagenti. La teoria della velocità assoluta stabilisce che la barriera alla reazione è energetica ed entropica (figg. 1-6, 1-7). Infatti l'entalpia standard di attivazione (ΔH^\ddagger) ha un valore molto vicino a quello dell'energia di attivazione (E_a), cioè l'unica barriera energetica alla reazione considerata dalla teoria della collisione. Quindi anche la teoria della velocità assoluta (come quella della collisione) indica che la velocità di reazione è bassa se l'energia di attivazione è grande; inoltre la stessa teoria aggiunge che la velocità di reazione è bassa se l'entropia di attivazione è negativa con un alto valore assoluto (fig. 1-7).

Come detto sopra, i valori delle costanti cinetiche calcolate in accordo con la teoria della velocità assoluta, sono, rispetto a quelli delle costanti cinetiche calcolate seguendo la teoria della collisione, più vicini ai valori delle costanti cinetiche delle stesse reazioni ottenuti sperimentalmente. Ciò suggerisce che la componente entropica sia presente in molte reazioni bimolecolari.

Energia libera ed equilibrio chimico.

L'energia libera è la funzione di stato che meglio descrive la natura dell'equilibrio chimico:

Il ΔG° di formazione dei composti indica la stabilità termodinamica delle loro molecole.

Il ΔG° di reazione indica la spontaneità della reazione.

Esso risulta dalla differenza tra i ΔG° di formazione dei prodotti con il ΔG° di formazione dei reagenti (dal ΔG° di reazione si può calcolare la K_{eq} e viceversa).

Il ΔG^\ddagger di attivazione indica la barriera alla reazione tra due molecole, cioè la maggiore o minore inerzia a reagire di queste molecole ed in definitiva la velocità di reazione.

In una reazione esergonica i reagenti sono termodinamicamente meno stabili e cineticamente meno inerti dei prodotti di reazione, per cui nelle condizioni standard la reazione sarà spontanea verso destra.

La spontaneità della reazione indica sempre che i prodotti sono più stabili e più inerti dei reagenti, poichè sebbene non ci sia relazione tra il valore del ΔG° di reazione ed il valore del ΔG^\ddagger di attivazione, il valore dell'energia libera di attivazione della reazione diretta (ΔG^\ddagger_d) sarà sempre minore del valore dell'energia libera di attivazione

della reazione inversa (ΔG^\ddagger_1) perchè quest'ultima è sempre aumentata del valore del ΔG° di reazione (vedere fig. 1-8).

$$\Delta G^\ddagger_1 = \Delta G^\ddagger_2 + \Delta G^\circ$$

Fanno eccezione le reazioni che hanno ΔG° di reazione uguale a zero, per cui l'energia libera di attivazione risulta uguale nei due sensi di reazione.

Il punto di equilibrio di una reazione risulterà dal diverso grado di stabilità termodinamica dei reagenti rispetto ai prodotti e conseguentemente dal diverso grado di inerzia a reagire esistente tra reagenti e prodotti (fig. 1-8).

Infatti se indichiamo il punto di equilibrio come il rapporto del prodotto delle concentrazioni dei prodotti sul prodotto delle concentrazioni dei reagenti (che è espresso dalla K_{eq}), esso è stabilito termodinamicamente dalla differenza tra l'energia libera standard di formazione dei prodotti e quella dei reagenti:

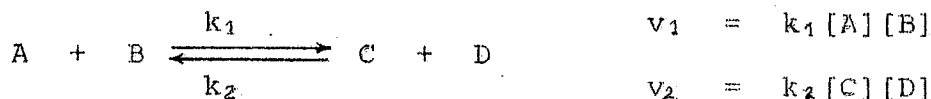
$$\Delta G^\circ (\text{prodotti}) - \Delta G^\circ (\text{reagenti}) = \Delta G^\circ \text{ di reazione}$$

e cineticamente dalla differenza dell'energia libera di attivazione della reazione inversa e l'energia libera di attivazione della reazione diretta.

$$\Delta G^\ddagger_2 - \Delta G^\ddagger_1 = \Delta G^\circ \text{ di reazione}$$

Prendendo ancora in considerazione una reazione esergonica, risulta evidente che sebbene i prodotti siano più stabili e quindi più inerti dei reagenti, l'equilibrio verrà comunque raggiunto e mantenuto proprio perchè è dinamico e risulterà spostato verso destra. All'equilibrio ci saranno più molecole di reagenti che di prodotti. Infatti, con T costante, anche nelle condizioni di equilibrio ($\Delta G = 0$), l'energia libera di attivazione della reazione inversa sarà sempre maggiore di quella della reazione diretta. Quindi solo se i prodotti avranno una concentrazione maggiore dei reagenti, questa differenza energetica potrà essere superata (fig. 1-9). Ciò diviene evidente se ragioniamo utilizzando le costanti cinetiche.

Se la reazione è esoergonica k_1 è maggiore di k_2 .



Essendo k_1 e k_2 costanti, la differenza tra v_1 e v_2 può essere annullata solo se i reagenti ed i prodotti della reazione hanno valori di concentrazione che moltiplicati rispettivamente con k_1 e k_2 risultino in valori uguali di v_1 e v_2 .

All'equilibrio si ha:

$$[A] [B] k_1 = [C] [D] k_2$$

$$[A] [B] k_1 - [C] [D] k_2 = 0$$

ed infatti la K_{eq} è uguale sia al rapporto delle costanti

cinetiche della reazione che al rapporto dei prodotti delle concentrazioni dei reagenti e dei prodotti.

$$K_{eq} = \frac{k_1}{k_2} = \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

La reazione è in equilibrio quando il prodotto della concentrazione dei prodotti su quello delle concentrazioni dei reagenti è uguale al valore di K_{eq} ed indipendentemente dai valori assoluti delle concentrazioni stesse (pag.4). La maggiore concentrazione dei prodotti rispetto ai reagenti porta la velocità della reazione inversa (v_2) ad eguagliare quella della velocità diretta (v_1) perchè con l'aumentare della concentrazione le molecole dei reagenti si urteranno più frequentemente ed aumenterà nell'unità di tempo il numero degli urti capaci di dare un complesso intermedio che possa decomporsi in reagenti. Contemporaneamente le concentrazioni dei reagenti diminuiscono ed anche la v_1 è diminuita. Quindi nelle reazioni esoergoniche, occorre una concentrazione di prodotti maggiore di quella dei reagenti, per avere nell'unità di tempo arbitraria un numero di reazioni inverse uguale a quello delle reazioni dirette, perchè i prodotti, essendo più stabili, quindi più inerti, reagiscono meno frequentemente. Anche quando la reazione è all'equilibrio le singole coppie di molecole di prodotti che si incontrano e formano il complesso attivato, devono superare le rispettive barriere costituite dall'energia libera di attivazione che mantengono invariato il loro valore. Infatti la differenza tra l'energia libera di attivazione della reazione diretta e di quella della reazione inversa, risulta uguale alla differenza tra stabilità termodinamica dei reagenti e prodotti, e questa differenza non è annullata all'equilibrio ed egualmente non sono cambiati i valori di reattività dei reagenti e dei prodotti. All'equilibrio, se non viene variata la T , le costanti cinetiche della reazione non variano perchè non è cambiata la forza di legame tra gli atomi che devono reagire, né la natura del complesso attivato a più basso contenuto energetico, cioè del passaggio obbligato della reazione.

Un osservatore che potesse vedere i complessi attivati, vedrebbe che, nell'unità di tempo, in qualsiasi reazione, il numero dei complessi formati dai reagenti e quello formato dai prodotti sono uguali solo all'equilibrio (fig. 1-9). Ciò porta a zero il valore del ΔG della reazione, ma non è cambiato niente nelle caratteristiche della reazione diretta e né di quella inversa. Non sono cambiati i ΔG di reazione e i ΔG^\ddagger di attivazione.

Sommario

1) La somma dell'energia libera dei legami (ΔG° di legame) di una molecola da il valore dell'energia libera (ΔG°) di formazione della molecola e cioè della stabilità termodinamica della molecola.

2) La differenza tra il ΔG° di formazione dei prodotti ed il ΔG° di formazione dei reagenti da il ΔG° di reazione (energia libera standard di reazione) che:

se ΔG° di reazione è < 0 la reazione è esergonica, spontanea verso destra partendo dalle condizioni standard;

se ΔG° di reazione è > 0 la reazione è endoergonica, spontanea verso sinistra partendo dalle condizioni standard;

se ΔG° di reazione è $= 0$ la reazione è all'equilibrio in condizioni standard.

3) La variazione dell'energia libera in condizioni diverse da quelle standard (di T, concentrazioni di reagenti e/o prodotti ecc.) può essere calcolata:

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[\text{Prodotto-1}] [\text{Prodotto-2}]}{[\text{Reagente 1}] [\text{Reagente 2}]}$$

se ΔG è < 0 la reazione ha spontaneità verso destra

se ΔG è > 0 la reazione ha spontaneità verso sinistra

La spontaneità indicata dal ΔG° è "indipendente" dal valore del ΔG° della reazione, nel senso indicato in fig. 1-2.

Se il ΔG° è $= 0$ la reazione è all'equilibrio e

$$0 = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[\text{Prodotto-1}] [\text{Prodotto-2}]}{[\text{Reagente-1}] [\text{Reagente-2}]}$$

4) Dal ΔG° si può calcolare la K_{eq}

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_{eq}$$

che non è altro che il rapporto del prodotto delle concentrazioni dei prodotti con quello delle concentrazioni dei reagenti quando la reazione è all'equilibrio.

$$K_{eq} = \frac{[\text{Prodotto-1}] [\text{Prodotto-2}]}{[\text{Reagente-1}] [\text{Reagente-2}]}$$

Se la K_{eq} è > 1 la reazione è spontanea verso destra in condizioni standard

Se la K_{eq} è < 1 la reazione è spontanea verso sinistra in condizioni standard

Se La K_{eq} è $= 1$ la reazione è all'equilibrio

Il rapporto del prodotto delle concentrazioni dei prodotti con quello delle concentrazioni dei reagenti rimane costante a T costante, indipendentemente dalle concentrazioni che i reagenti e prodotti avevano prima di raggiungere l'equilibrio.

5) L'energia libera di formazione del complesso attivato (ΔG^\ddagger) è la barriera all'avvenire della reazione diretta e rappresenta l'inerzia cinetica a reagire dei reagenti. Dal ΔG^\ddagger e da altri parametri della reazione di formazione del composto attivato si può calcolare la costante cinetica della reazione diretta $k_{rb}(k_1)$.

6) Il ΔG° di reazione risulta anche dalla differenza esistente tra energia libera di attivazione della reazione diretta (ΔG^\ddagger_d) e l'energia libera di attivazione della reazione inversa (ΔG^\ddagger_i). Quindi il ΔG° di reazione rappresenta la differenza tra la stabilità termodinamica dei prodotti e quella dei reagenti, ed anche la differenza tra inerzia cinetica dei reagenti e quella dei prodotti.

7) Conoscendo le costanti cinetiche della reazione e le concentrazioni dei reagenti e dei prodotti, si può conoscere la velocità di reazione e quindi il tempo necessario per raggiungere l'equilibrio.

$$v_1 = k_1 [\text{Reagente-1}] [\text{Reagente-2}] \quad (\text{velocità della reazione diretta})$$

$$v_2 = k_2 [\text{Prodotto-1}] [\text{Prodotto-2}] \quad (\text{velocità della reazione inversa})$$

All'equilibrio si avrà che $v_1 = v_2$ ed il rapporto tra

$$\frac{k_1}{k_2} = \frac{[\text{Prodotto-1}] [\text{Prodotto-2}]}{[\text{Reagente-1}] [\text{Reagente-2}]} = K_{eq}$$

8) Il rapporto di k_1 con k_2 è uguale alla K_{eq} perchè k_1/k_2 è uguale al rapporto del prodotto delle concentrazioni dei prodotti sul prodotto delle concentrazioni dei reagenti in condizioni di equilibrio.

9) Quindi, come il ΔG° di reazione rappresenta la differenza di stabilità termodinamica esistente tra prodotti e reagenti in condizioni standard, e quindi la differenza di inerzia cinetica tra reagenti e prodotti, così la K_{eq} rappresenta le stesse cose misurate come rapporti di prodotti di concentrazioni o di costanti cinetiche. Conoscendo il ΔG° o la K_{eq} si conosce la spontaneità della reazione in condizioni standard, ma non la sua velocità. Conoscendo il ΔG^\ddagger si conosce la spontaneità e la velocità della reazione in condizioni standard.

Super sommario

1) ΔG° di legame \longrightarrow ΔG° di formazione della molecola
(stabilità termodinamica della molecola)

2) ΔG° prodotti - ΔG° reagenti = ΔG° di reazione
(spontaneità della reazione in condizioni standard)

3)
$$K_{eq} = \frac{[P1][P2]}{[R1][R2]}$$
 All'equilibrio il rapporto del prodotto delle concentrazioni dei prodotti con quello delle concentrazioni dei reagenti è una costante detta di equilibrio, che è indipendente dalle concentrazioni che reagenti e prodotti avevano prima che la reazione avesse inizio ed è dipendente solo dalla T.

4) $\Delta G^\circ = -RT \ln K_{eq}$, eguaglianza tra ΔG° e K_{eq} .
Il valore del ΔG° è la misura della spontaneità della reazione che inizia partendo dalle condizioni standard.

5)
$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[P1][P2]}{[R1][R2]}$$

Il ΔG è la misura della spontaneità di una reazione che inizia da condizioni diverse dalle condizioni standard

6) $\Delta G^\circ \ddagger$ = barriera alla reazione (inerzia a reagire delle molecole)

7)
$$k_{1b} = k_t \frac{K_B T}{h} e^{-(\Delta G^\circ \ddagger / RT)}$$
 equazione che pone in relazione il $\Delta G^\circ \ddagger$ (di attivazione) e la costante cinetica (k_{1b}) della reazione bimolecolare che avviene in un unico passaggio.

8) $\Delta G^\circ \ddagger_d - \Delta G^\circ \ddagger_i = \Delta G^\circ$ di reazione.

Relazione tra inerzia cinetica e stabilità termodinamica dei composti)

9)
$$\frac{k_1}{k_2} = K_{eq}$$
 Il rapporto tra la costante cinetica della reazione diretta con quella della reazione inversa è una costante con valore uguale alla K_{eq} .

Tab. 1-1

Valori dell'entropia e proprietà fisiche delle sostanze. Il valore dell'entropia (S) del macrostato di una sostanza è in relazione al numero delle disposizioni possibili del microstato, cioè delle molecole, atomi e particelle sub-atomiche che compongono la sostanza. Le diverse disposizioni del microstato risultano in caratteristiche misurabili diverse dal macrostato.

S°	>	S°	>	S°	>	S°
(gas)		(liquidi)		(solidi morbidi)		(solidi duri)
				(es. Pb)		(es. diamante)

S° (gas in soluzione) > S° (gas)

S° (liquido in soluzione acquosa) > S° (liquido)

S° (solido in soluzione acquosa) > S° (solido)

S° (molecola complessa) > S° (molecola semplice)

S° (massa
molecolare maggiore) > S° (massa molecolare
minore)

Tab. 1-2

Relazione tra il valore della costante di equilibrio ed il ΔG° di reazione.

Keq	ΔG° (25°C)	ΔG° (37°C)
1000	-4,092	-4,257
100	-2,728	-2,838
10	-1,364	-1,419
1	0	0
0,1	+1,364	+1,419
0,01	+4,092	+4,257

$$\Delta G^\circ = -RT \ln Keq$$

$$R = 1,987 \cdot 10^{-3} \text{ kcal/grad} \cdot \text{mole}$$

$$T = 298 \text{ } 25^\circ\text{C}; \quad T = 310 \text{ } 37^\circ\text{C}$$

$$\text{Fattore di conversione di } \ln \text{ in } \log_{10} = 2,303$$

$$\Delta G^\circ = -1,364 \log_{10} Keq \text{ (a } 25^\circ\text{C)}$$

$$\Delta G^\circ = -1,419 \log_{10} Keq \text{ (a } 37^\circ\text{C)}$$

Fig. 1-1

L'energia libera (G) è la funzione che esprime il potenziale chimico (in condizioni di P e T costanti).

(Da "Chemical Principles", R.E. Dickerson, H.B. Gray, G.P. Haight, 2nd Ed., 1974, Benjamin Inc., USA, ridisegnato e modificato).

Il massimo valore di potenziale chimico, cioè la massima spontaneità, si verifica nei punti di massima distanza dal punto di equilibrio, quando sono presenti solo reagenti o solo prodotti. Con il procedere della reazione l'energia libera diminuisce e raggiunge il suo valore minimo all'equilibrio.

La figura mostra la variazione dell'energia libera di una ipotetica reazione reversibile di due reagenti che formano due prodotti. La reazione ha $K_{eq} = 1$ e un $\Delta G^\circ = 0$, quindi è all'equilibrio in condizioni standard (vedere fig. 1-2).

La spontaneità della reazione è data da variazioni negative dell'energia libera G). Quindi la reazione potrà procedere spontaneamente da sinistra verso destra, se si trova nelle condizioni a sinistra del punto di equilibrio, e da destra verso sinistra se si trova nelle condizioni a destra del punto di equilibrio. Poiché la reazione descritta ha $K_{eq} = 1$, per $[R] > [P]$ procederà verso destra, per $[R] < [P]$ verso sinistra. La reazione procederà fino a quando si avrà $[R] = [P]$.

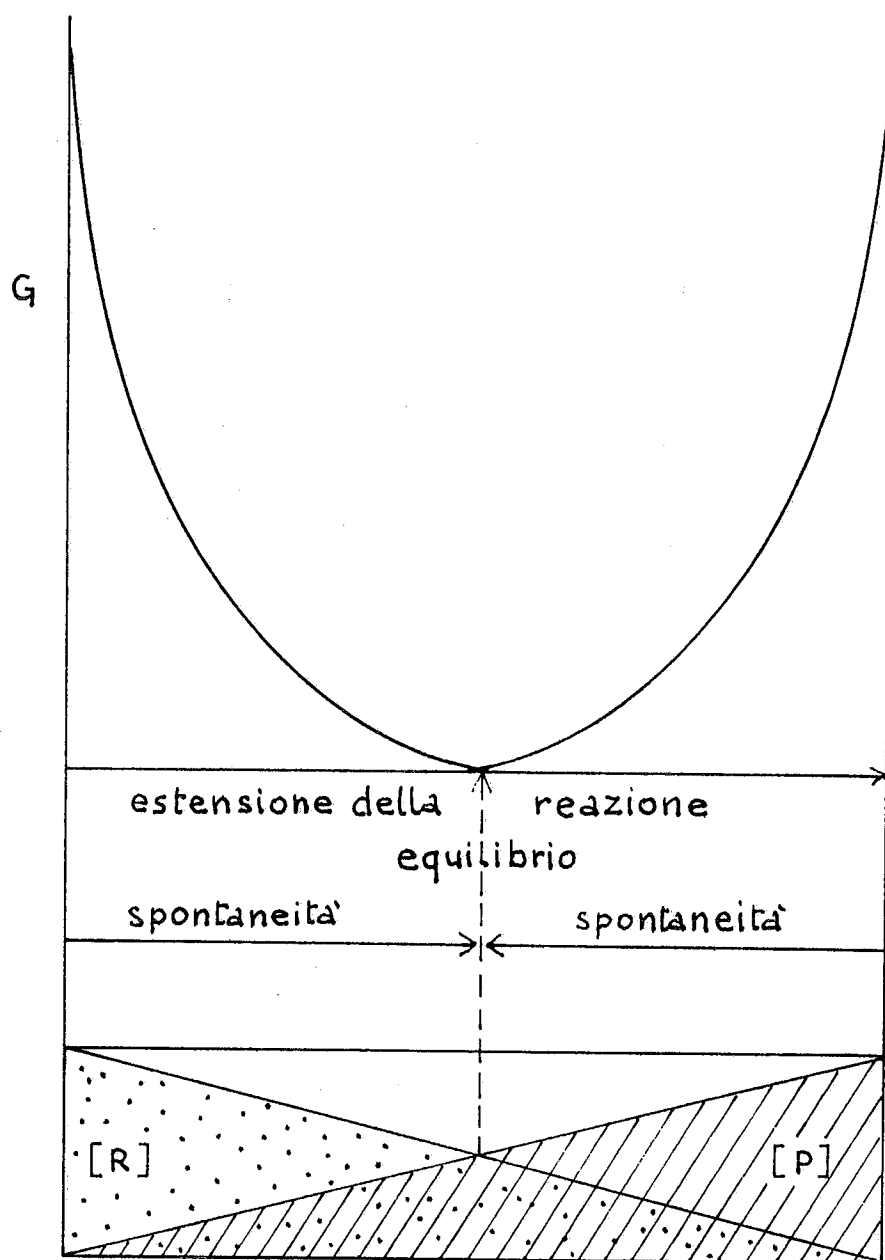


Fig 1-1

Fig. 1-2

Il sistema di reagenti che si trasformano in prodotti e di prodotti che formano reagenti è rappresentato da due serbatoi di uguali dimensioni contenenti definiti volumi di un liquido, comunicanti tra loro mediante un tubo munito di un rubinetto.

L'energia della trasformazione chimica è rappresentata dal fluire del liquido da un serbatoio all'altro. Il liquido nel serbatoio di sinistra rappresenta i reagenti (R) e quello nel serbatoio di destra i prodotti (P) della reazione. Il dislivello tra i due serbatoi, che determina la spontaneità "naturale" del liquido a spostarsi nel sistema dei vasi comunicanti quando nei due vasi è presente un ugual volume di liquido, rappresenta la variazione di energia libera della reazione (ΔG°) in condizione standard, cioè quando i reagenti ed i prodotti sono tutti presenti in concentrazione 1 M.

Il dislivello tra i due serbatoi è calcolato sottraendo l'altezza del serbatoio di sinistra da quella del serbatoio di destra, così se il serbatoio di destra è più basso, la differenza è negativa e corrisponde ad un ΔG° negativo e quindi ad una spontaneità verso destra (a-d).

Il dislivello della superficie del liquido nei due serbatoi determina la spontaneità del liquido a spostarsi da un serbatoio all'altro, indipendentemente dalla presenza o meno di un dislivello tra i serbatoi (a.c.g.h.l) e rappresenta la variazione di energia libera (ΔG).

a-d rappresenta una reazione con ΔG° negativo.

a) conoscendo il dislivello tra i due serbatoi si può prevedere la spontaneità verso destra anche se il rubinetto tra i due serbatoi è chiuso. Così conoscendo che la reazione ha un ΔG° negativo, si conosce che in condizioni standard la reazione ha spontaneità verso destra senza dover necessariamente mescolare reagenti e prodotti, e aspettare che reagiscano per capire in quale direzione procede la reazione. Bisogna tener presente che molte reazioni procedono in tempi lunghissimi, per cui anche mescolando i reagenti non potremmo osservare la reazione; da ciò l'importanza di conoscere il valore del ΔG° al fine di conoscere la spontaneità della reazione e magari ricercare un opportuno catalizzatore. Non conoscendo la K_{eq} della reazione, il ΔG° può essere calcolato per differenza tra l'energia libera di formazione dei prodotti e quella dei reagenti.

b) il rubinetto è stato aperto; partendo dalle condizioni di ugual volume di liquido nei due serbatoi, c'è stato un trasferimento spontaneo di liquido dal serbatoio di sinistra verso quello di destra, fino a raggiungere l'equilibrio con il liquido allo stesso livello nei due serbatoi.

L'equilibrio è raggiunto annullando il dislivello tra i due serbatoi, compensato proprio con il trasferimento di liquido. L'esempio idraulico corrisponde ad una reazione con ΔG° negativo, in cui partendo dalle condizioni standard sono stati mescolati i reagenti ed i prodotti e si è aspettato tutto il tempo necessario che reagissero e raggiungessero l'equilibrio.

In c) si è chiuso il rubinetto dopo che il sistema ha

raggiunto l'equilibrio descritto in b) e quindi si è aggiunto del liquido nel serbatoio di destra per mostrare che il dislivello tra le due superfici del liquido nei due serbatoi porta la spontaneità nel senso inverso a quella data dal dislivello tra gli stessi serbatoi. Abbassando il livello del liquido in R (figura c), si ha lo stesso effetto sulla spontaneità.

d) quando il rubinetto viene aperto il liquido fluisce verso sinistra fino a raggiungere un nuovo equilibrio. Egualmente quando una reazione con spontaneità verso destra in condizioni standard ($\Delta G^\circ < 0$) ha raggiunto l'equilibrio ($\Delta G = 0$) è sufficiente aumentare la concentrazione dei reagenti per far procedere la reazione verso sinistra. All'equilibrio le reazioni non hanno più spontaneità e l'equilibrio può essere modificato anche per piccolissime variazioni di concentrazione di reagenti e/o prodotti che faranno procedere la reazione in un senso o nell'altro, fino a raggiungere il nuovo equilibrio.

In e-h) i due serbatoi sono allo stesso livello, e se in ambedue è presente lo stesso volume di liquido, anche il livello dei due liquidi sarà lo stesso ed il liquido non ha spontaneità a fluire in un senso o nell'altro.

Ciò è mostrato in f), dove il rubinetto è stato aperto e non si è osservato nessun cambiamento nel livello del liquido nei due serbatoi. Questa condizione corrisponde ad una reazione che ha il $\Delta G^\circ = 0$, cioè che in condizioni standard è anche all'equilibrio. Essa ha quindi una $K_{eq} = 1$.

Rappresenta quindi un caso particolare di reazione che non ha spontaneità "naturale", che obbedisce comunque alle leggi dell'equilibrio chimico come indicato in g) ed h).

L'esempio in figura g) mostra la spontaneità verso destra, ma sarà sufficiente aumentare il volume del liquido nel serbatoio di destra (o diminuire il liquido in quello di sinistra), che il liquido fluirà spontaneamente verso l'altro serbatoio fino a raggiungere un nuovo equilibrio.

L'unica differenza con i serbatoi a-d è che all'equilibrio i serbatoi e-h contengono sempre uguali volumi di liquido.

In a-d i volumi sono diversi perchè parte del liquido è utilizzato per colmare il dislivello tra i due serbatoi.

In h-m) sono disegnati due serbatoi comunicanti in cui quello a destra ha un dislivello positivo, per cui se nei due serbatoi c'è un ugual volume di liquido, esso tenderà a fluire da destra verso sinistra. Per questi serbatoi valgono gli stessi ragionamenti fatti per quelli in h-m), infatti basterà invertire la posizione relativa tra i due serbatoi h-m che essi divengono identici a quelli in a-d). I serbatoi in h-m) corrispondono ad una reazione che in condizioni standard ha spontaneità verso sinistra ($\Delta G^\circ > 0$) in relazione a come è scritta nell'unità stechiometrica. Il ΔG° risulta positivo per le convenzioni stabilite per calcolare il ΔG° ; tuttavia in queste reazioni valgono tutte le considerazioni fatte sopra per le reazioni con $\Delta G < 0$. Anche per le reazioni con $\Delta G^\circ > 0$, valgono le leggi dell'equilibrio chimico: infatti, quando hanno raggiunto l'equilibrio, la loro spontaneità può essere modificata aumentando la concentrazione dei reagenti (l-m).

L'analogia tra gli spostamenti di un liquido in vasi comunicanti e le reazioni chimiche, deve essere limitato

alle considerazioni fatte sopra, perchè altri aspetti non corrispondono del tutto. All'equilibrio il rapporto tra il prodotto delle concentrazioni dei prodotti e quello delle concentrazioni dei reagenti è costante, con T costante indipendentemente dalla concentrazione di partenza, ed è appunto espresso dalla K_{eq} ; mentre il rapporto dei volumi di liquido nei due serbatoi tende ad 1 con l'aumentare del liquido nei serbatoi, perchè il liquido nei serbatoi si aggiunge, ed il rapporto è un rapporto di somme e non di prodotti come è nel calcolo della K_{eq} .

Un'altra non corrispondenza è data dalla velocità di flusso dei liquidi nei serbatoi che dipende dal dislivello del pelo dell'acqua indipendentemente dal livello dei serbatoi, mentre la velocità della reazione è in relazione alle concentrazioni dei reagenti e prodotti, ma anche alla direzione di reazione.

La reazione nella direzione della perdita di energia libera è più veloce perchè chiede una energia di attivazione inferiore a quella della stessa reazione che procede in senso inverso (vedere fig. 3). Quindi il tubo tra i due serbatoi in d) dovrebbe essere più sottile che in a) se volessimo rappresentare meglio le condizioni di reversibilità della reazione.

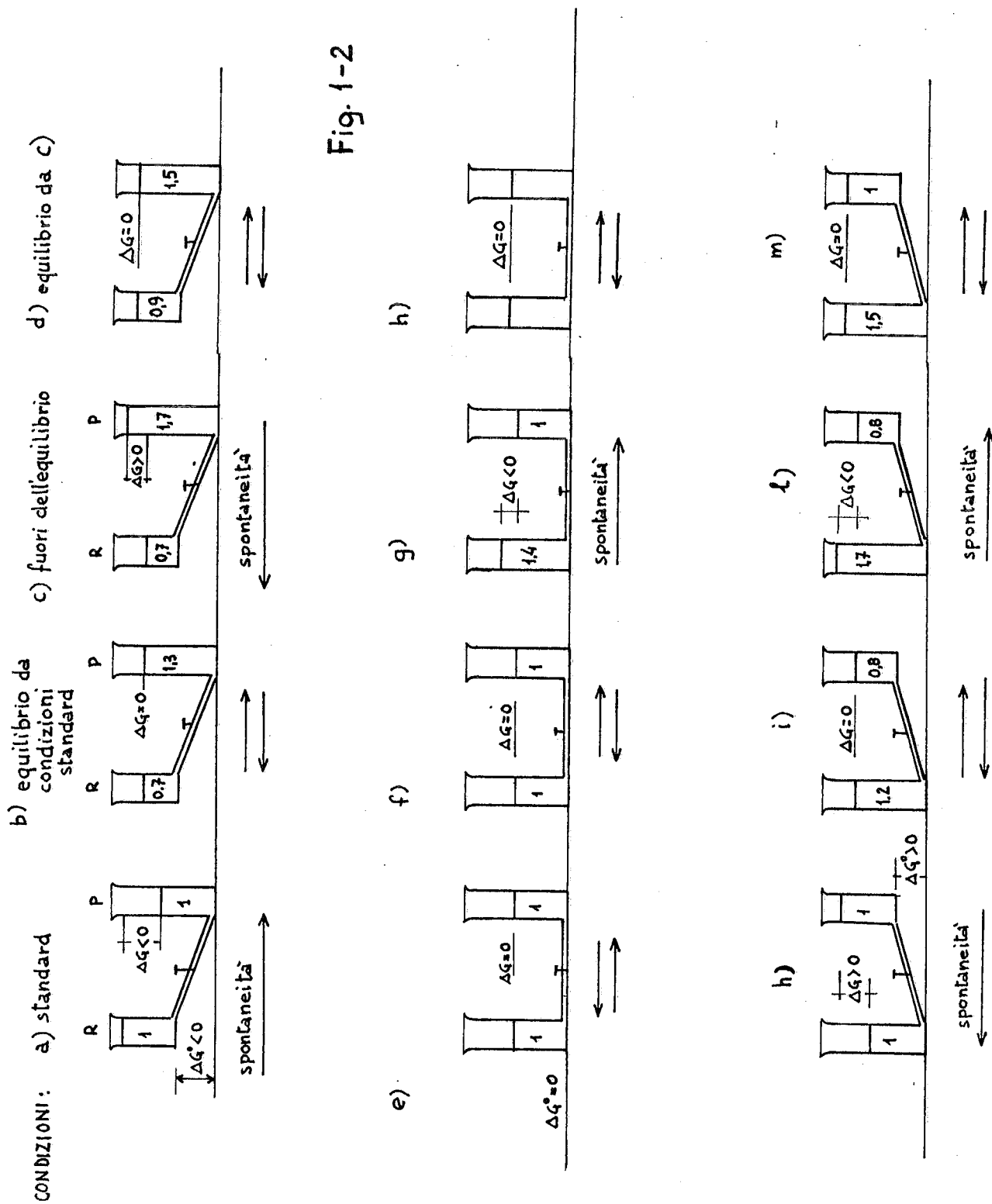
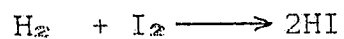


Fig. 1-3

Grafico di Arrhenius del logaritmo naturale della costante cinetica (k) della reazione:



e l'inverso della temperatura assoluta $1/T$. k è espresso in litri \times moli $^{-1}$ \times sec $^{-1}$.

(Da "General chemistry", L. Pauling, 3rd Ed., Freeman, USA).

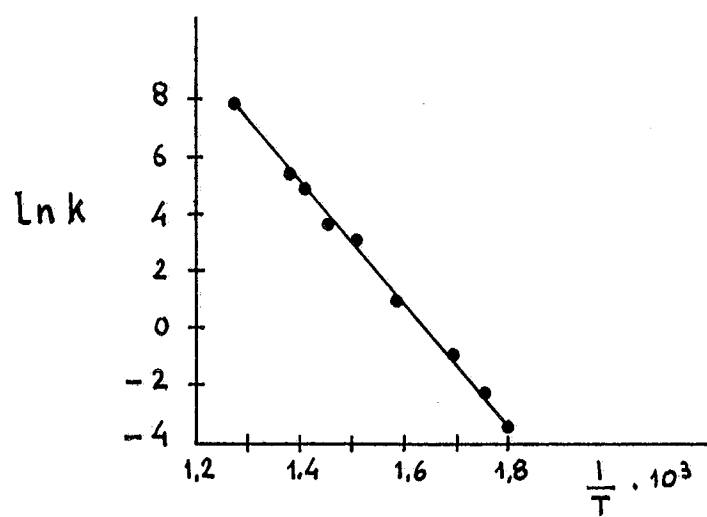


Fig. 1-3

Fig. 1-4

Energia di reazione ed energia di attivazione.

ΔH° = variazione di entalpia standard della reazione
 $A + B \longrightarrow C + D$

Ea^1 = energia di attivazione della reazione diretta

Ea^2 = energia di attivazione della reazione inversa

$\Delta H^\circ = Ea^2 - Ea^1$

(Da "Chemical Principles", R.E Dickerson, H.B. Gray, G.P. Haight, 2nd Ed., Benjamin Inc., USA).

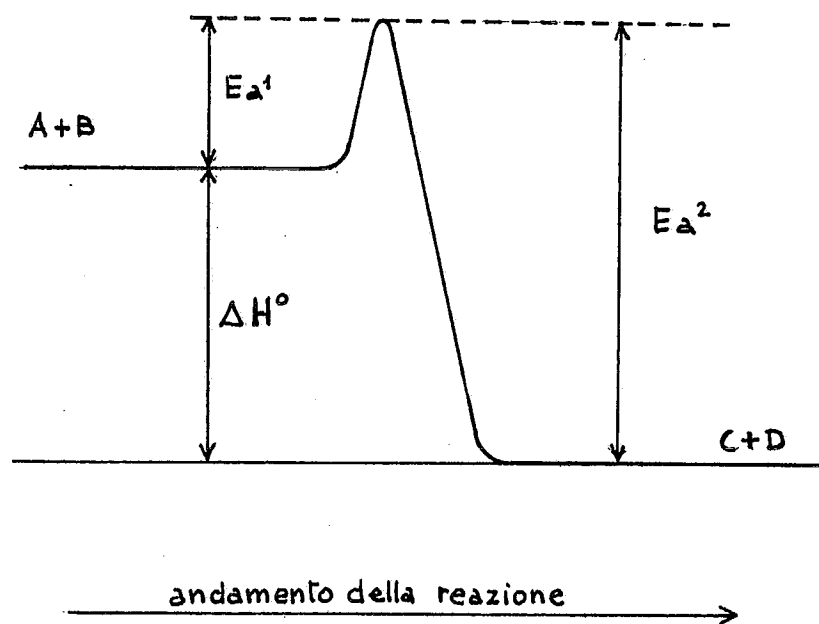


Fig. 1-4

Fig. 1-5

In a) le due molecole di reagenti sono lontane e non interagiscono tra loro. I loro atomi sono uniti da legami covalenti (linee continue).

b) Le molecole si sono avvicinate, si sono formate delle interazioni deboli (linee punteggiate) tra gli atomi di Cl e tra quelli di O. Ciò causa un indebolimento (linee tratteggiate) dei legami covalenti tra Cl ed O e quindi un allungamento dei legami stessi.

c) Si è formato il complesso attivato dove non esistono più legami covalenti ma interazioni deboli, per cui il complesso può evolvere verso la formazione dei prodotti o tornare indietro e formare nuovamente prodotti.

d) I due atomi di Cl (e così gli atomi di O₂) si sono ulteriormente avvicinati tra loro formando dei legami covalenti deboli. Cioè gli elettroni messi a comune tra i due atomi di Cl (e così quelli messi a comune tra gli atomi di O₂) ruotano intorno a questi atomi, e per frazioni di tempo inferiori anche tra l'atomo di Cl e quello di O, che erano in legame covalente quando le due molecole di ClO non interagivano tra loro. Le interazioni tra gli atomi di Cl ed O si sono ulteriormente indebolite e gli atomi si sono ulteriormente distanziati.

e) Si sono formate le 2 moli di prodotti Cl₂ ed O₂.

f) Variazione della entalpia (H) durante la reazione. Il grafico mostra che la reazione non ha energia di attivazione di Arrhenius (E_a). Tuttavia la reazione ha una barriera al suo avvenire, riscontrata sperimentalmente e calcolabile sulla base della teoria della collisione e della velocità assoluta.

Fig. 1-5

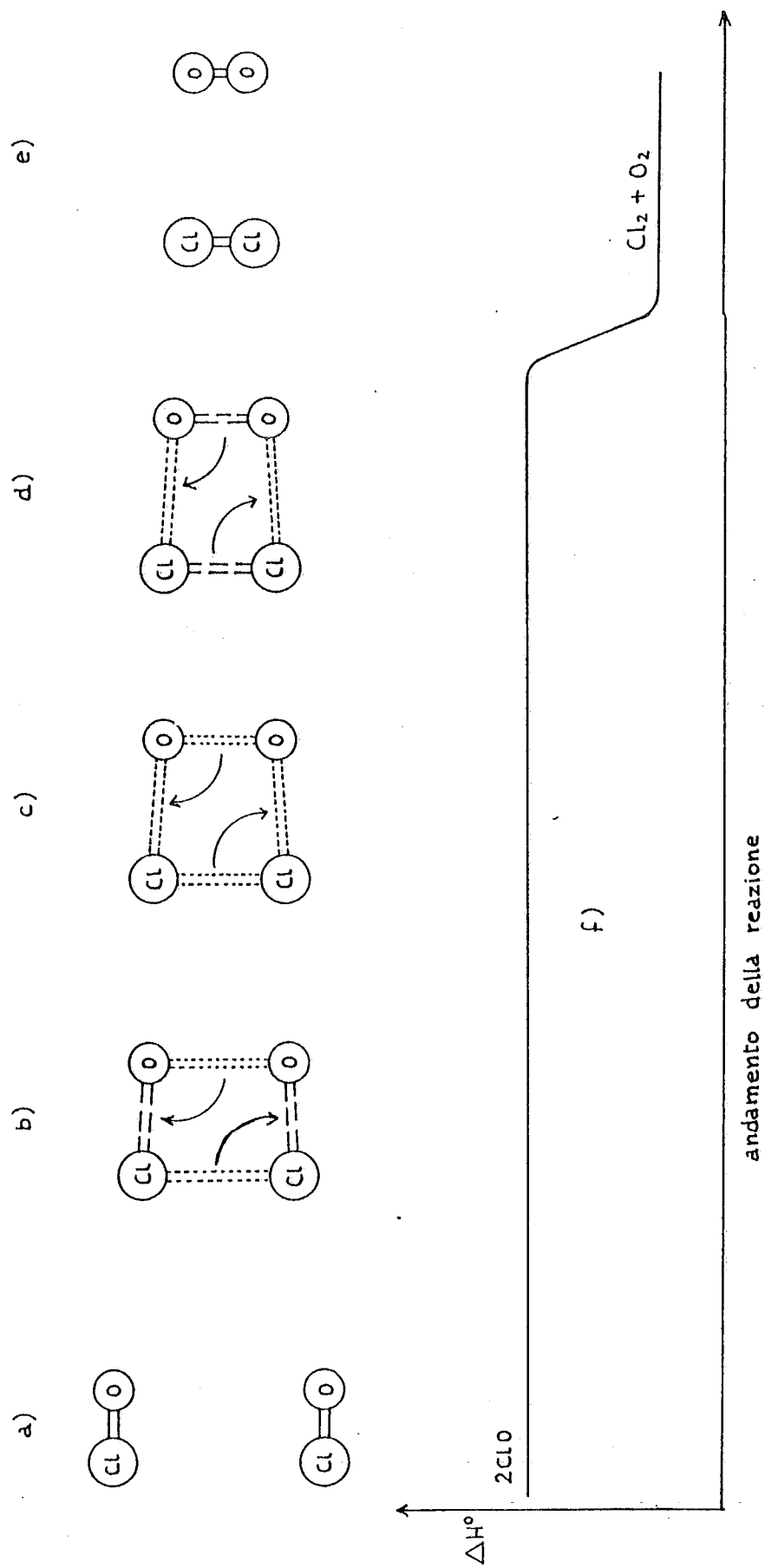


Fig. 1-6

Profilo della variazione di energia libera standard (ΔG°), entalpia standard (ΔH°) e dell'entropia standard ($-T\Delta S^\circ$) durante il decorso di una ipotetica reazione bimolecolare semplice.

In ascissa = parametro che indica il procedere della reazione.

a) La reazione $AA + BB \rightarrow 2AB$ è una reazione esoergonica (ΔG° negativo) che procede con la formazione di un complesso intermedio attivato.

Il complesso attivato ha una energia libera di formazione (ΔG°^\ddagger) positiva sia nel senso della reazione diretta che di quella inversa, per cui il suo contenuto di energia libera è superiore ai reagenti ed ai prodotti. Il ΔG°^\ddagger rappresenta l'energia libera di attivazione (la barriera all'avvenire della reazione) che include:

b) la componente entalpica (ΔH°^\ddagger) che è positiva nei due sensi della reazione, ed è circa la stessa quantità dell'energia di attivazione (E_a).

c) la componente entropica (ΔS°^\ddagger) che è negativa nei due sensi della reazione, il complesso attivato è infatti più ordinato sia dei reagenti che dei prodotti.

In c), per rendere più facile la lettura del grafico, sulle ordinate sono stati posti i valori di ($-T\Delta S^\circ$) piuttosto che quelli ΔS° , quindi se si ha un decremento di entropia (aumento di ordine), il ΔS° sarà negativo, e nel corrispondente tratto del grafico, risulterà una linea con pendenza positiva (verso l'alto), se l'entropia aumenta (aumento di disordine) il ΔS° sarà positivo e sul grafico risulterà una linea con pendenza negativa.

Inoltre in b) e c) sono rispettivamente indicate le componenti entalpiche ed entropiche del ΔG° di reazione. Nell'esempio è indicata una reazione in cui il valore negativo del ΔG° è dato prevalentemente da una perdita calorica a pressione costante (ΔH° negativo) e poco da un incremento di entropia, mentre il ΔG° di formazione ha un'alta componente entropica.

Fig. 1-6

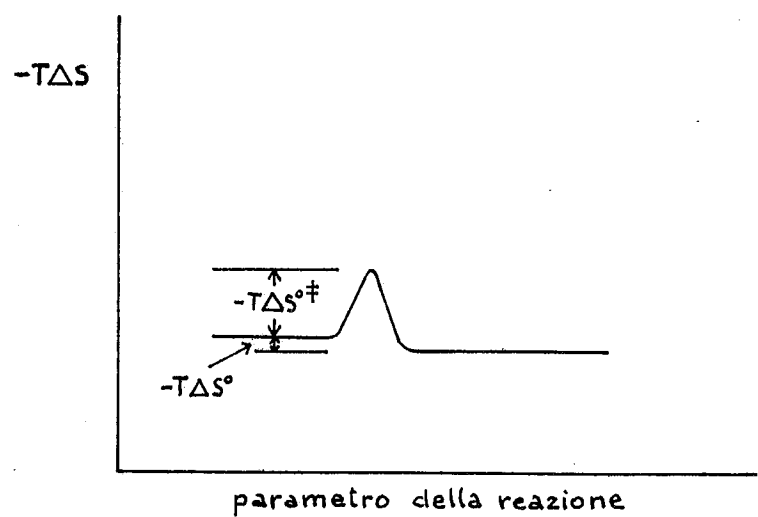
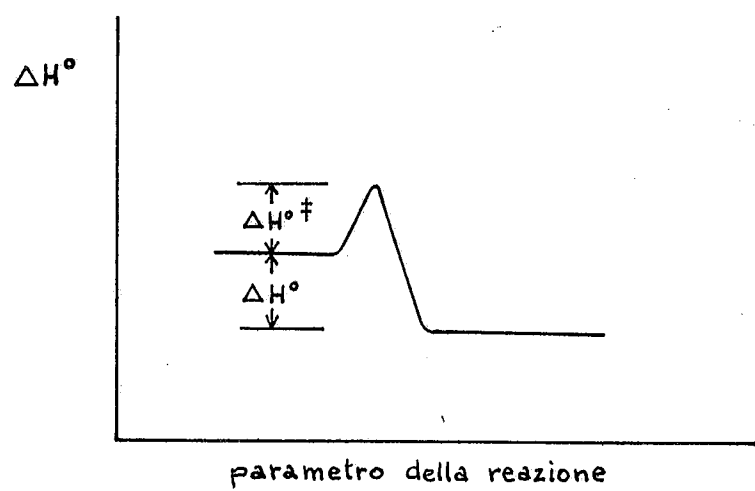
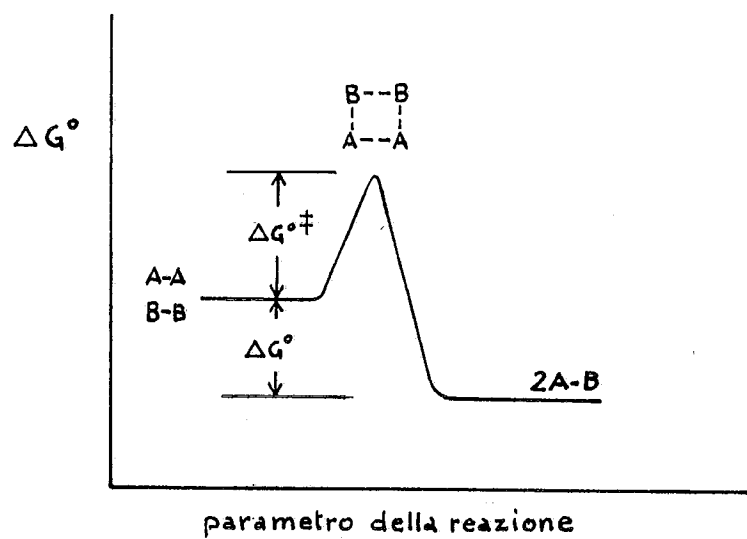


Fig. 1-7

Profilo della variazione di energia libera standard (ΔG°), entalpia standard (ΔH°), ed entropia standard ($-T\Delta S^\circ$) durante il decorso di una reazione bimolecolare semplice. In ascissa = parametro che indica il procedere della reazione.

- a) La reazione $AA + BB \longrightarrow 2AB$ è una reazione esoergonica (ΔG° negativo) che procede con la formazione di un complesso intermedio attivato che ha una energia libera di formazione (ΔG^\ddagger) positiva nei due sensi della reazione.
- b) La reazione ha una entalpia standard di formazione del complesso attivato (ΔH^\ddagger) uguale a zero, e quindi una energia di attivazione uguale a zero (vedere didascalie della fig. 1-6).
- c) La barriera alla reazione è costituita solamente dal decremento di entropia richiesto per avere la formazione del complesso attivato.

Si può pensare che le due molecole reagenti, al fine di formare un complesso attivato la cui energia di attivazione sia uguale a zero (e cioè l'annullamento dell'energia liberata dai legami che si formano per dare prodotti con quella assunta dai legami che si labilizzano nelle molecole reagenti), devono assumere una rispetto all'altra una disposizione molto precisa e quindi molto improbabile, per cui si avrà un valore fortemente negativo di entropia di formazione del complesso attivato.

Il profilo della variazione di energia libera durante il procedere della reazione è identico a quello della figura 1-6. Le due reazioni hanno infatti gli stessi valori di variazione di energia libera di reazione (ΔG°) e di formazione del complesso attivato (ΔG^\ddagger). Inoltre le due reazioni hanno gli stessi valori di variazione di entalpia standard (ΔH°) e di entropia standard ($-T\Delta S^\circ$) di reazione. Tuttavia esse differiscono notevolmente l'una rispetto all'altra per l'entalpia (ΔH^\ddagger) e per l'entropia standard (ΔS^\ddagger) di formazione del complesso attivato.

Fig. 1-7

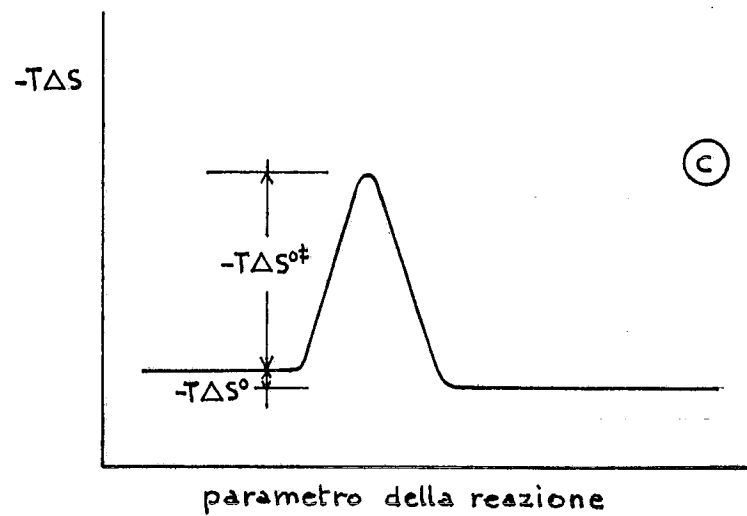
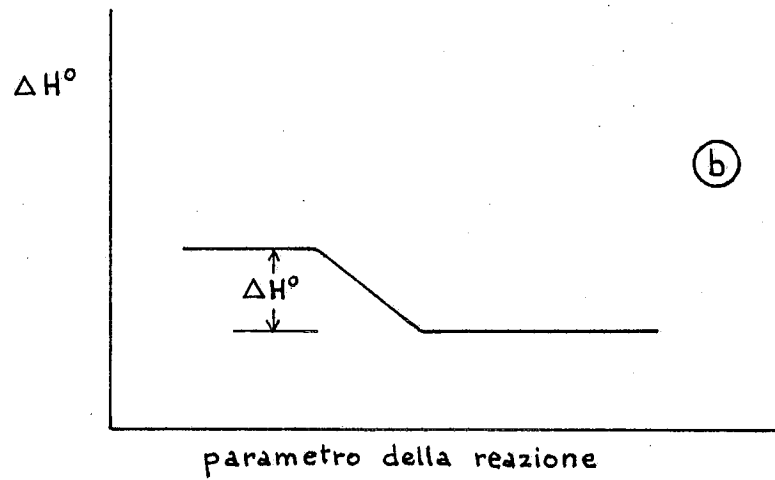
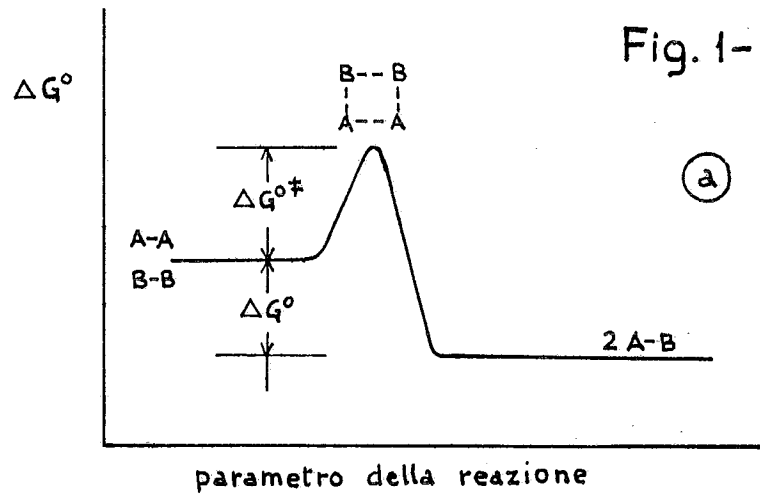


Fig. 1-8

Variazioni di energia libera standard di una reazione bimolecolare semplice esoergonica.

La stabilità termodinamica è data dall'energia libera standard di formazione dei composti (reagenti e prodotti), essa corrisponde all'energia liberata per formare i legami partendo dagli elementi costituenti le molecole dei reagenti e prodotti. L'energia libera di formazione di elementi allo stato di gas (H_2 , O_2 , Cl_2 , ecc.), allo stato liquido (Hg) o solido (Mg, C grafite, ecc.) è zero per definizione. Da ciò risulta che gli atomi liberi (H, O, Cl, ecc.) delle rispettive molecole allo stato gassoso hanno valori positivi di ΔG^0 di formazione perchè occorre fornire energia libera per dissociare le molecole in atomi. Più forti sono i legami tra gli atomi e maggiore è la stabilità delle molecole.

La spontaneità è rappresentata dall'energia libera standard ceduta durante la reazione; essa è data dalla differenza tra l'energia libera standard di formazione dei prodotti e dei reagenti.

L'inerzia a reagire è l'energia libera standard di formazione del complesso attivato, cioè l'energia necessaria a labilizzare i legami degli atomi dei reagenti e per disporli nella geometria giusta per poter reagire e formare i prodotti. La differenza tra l'energia libera standard di formazione del complesso attivato della reazione diretta, meno l'energia libera standard di formazione del complesso attivato della reazione inversa, dà anch'essa l'energia libera standard di reazione. L'energia libera di attivazione (inerzia a reagire) è in relazione inversa alla velocità di reazione (reattività). L'instabilità raggiunge il suo valore minimo quando i prodotti di reazione non sono reagenti di altre reazioni esoergoniche.

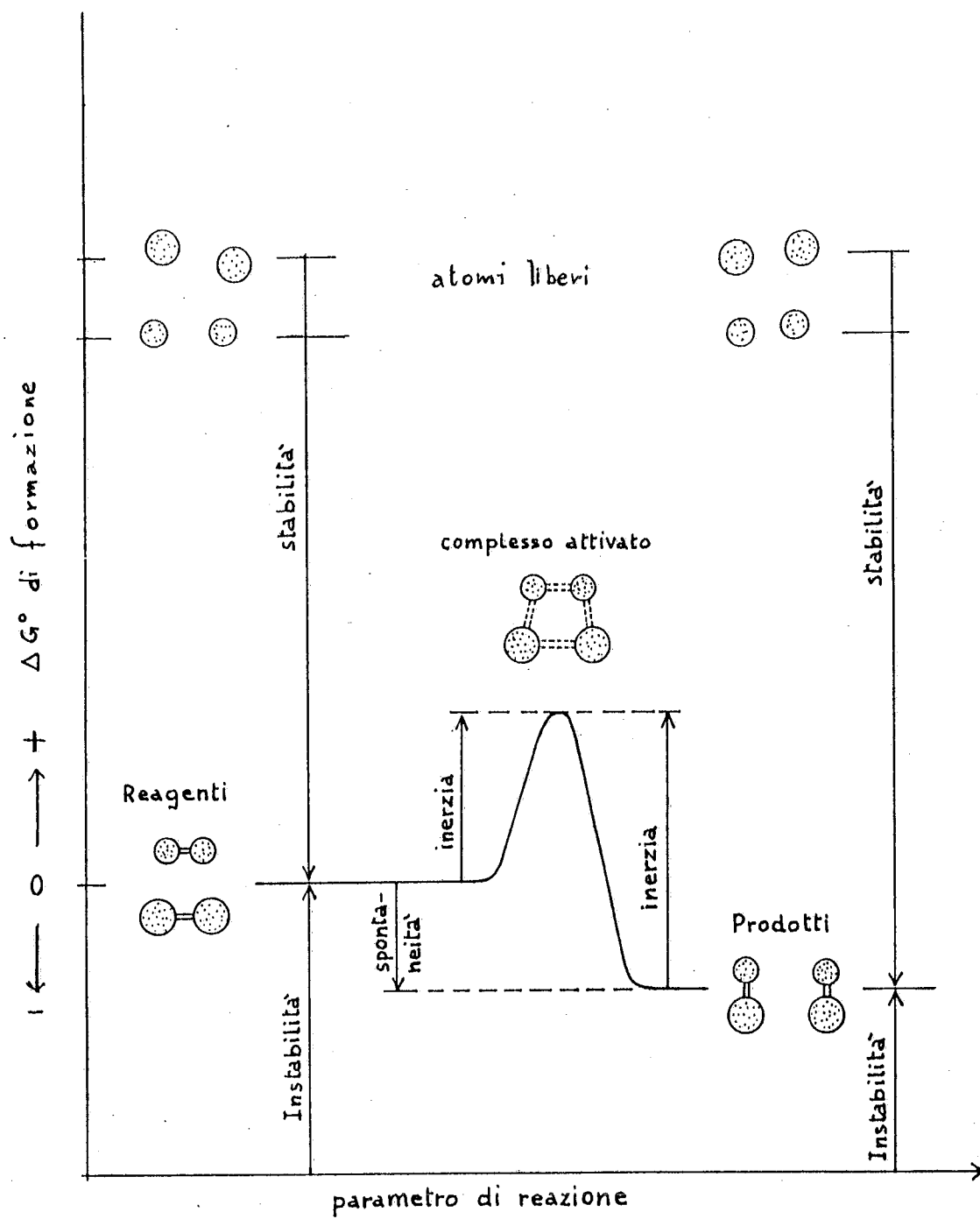


Fig. 1-8

Fig. 1-9

La figura mostra la barriera dell'energia libera di attivazione di una reazione reversibile bimolecolare semplice esotermica: $AC + BD \rightleftharpoons AB + CD$.

I reagenti ed i prodotti sono tutti soluti.

L'ordinata indica un parametro che descrive l'andamento della reazione, l'ascissa, le variazioni di energia libera in condizioni standard (1-9a), ed in 1-9b la variazione di energia libera in condizioni di equilibrio raggiunto partendo da condizioni standard. Sul terzo asse, che non è una coordinata, sono allineate rispettivamente coppie di molecole di reagenti e prodotti che si incontrano raggiungendo valori diversi di energia libera.

Per alcune coppie di molecole l'energia libera (energia ed ordine) acquisita nella collisione tra loro, è sufficiente a formare un complesso attivato capace di decomporre in prodotti o reagenti. Nella figura, per descrivere i diversi livelli energetici, le coppie di reagenti e prodotti sono stati posti spazialmente separati, con l'energia di attivazione posta tra loro.

a) La figura descrive la reazione in condizioni standard. I reagenti ed i prodotti sono tutti in concentrazione 1 M; per semplificare sono state disegnate solo 12 coppie di reagenti (AC e BD) e 12 coppie di prodotti (AB e CD). La reazione è osservata in un dato momento in cui si sono formati 8 complessi attivati e si assume che tale momento rappresenti il reale andamento della reazione quando reagenti e prodotti vengono mescolati. Delle dodici coppie di molecole di reagenti che si incontrano, 6 formano il complesso attivato capace di evolvere in prodotto. Delle dodici coppie di prodotti che si incontrano solo due formano il complesso attivato capace di evolvere in reagenti. Le coppie di reagenti o prodotti che interagiscono con energia insufficiente a formare il complesso attivato, sono indicati con frecce che si ripiegano su loro stesse per mostrare che le coppie di reagenti o prodotti si dissocieranno nuovamente senza aver reagito. La differenza nel numero dei complessi attivati in una unità arbitraria di tempo, è data dal fatto che le molecole dei prodotti, essendo più stabili di quelle dei reagenti, devono acquisire più energia dei reagenti, perchè devono superare una barriera energetica maggiore, al fine di formare il complesso attivato. Il complesso attivato è instabile dato il suo alto livello energetico, e può degradarsi in prodotti od in reagenti indipendentemente dal fatto che si sia formato da reagenti e prodotti. Per semplicità, in figura si è assunto che i complessi intermedi formati da reagenti, si degradino in prodotti, e quelli formati da prodotti in reagenti. Almeno altre quattro coppie di prodotti avrebbero acquisito nell'urto energia e ordine sufficiente a formare il complesso attivato, se l'energia libera di attivazione fosse uguale a quella della reazione diretta. La differenza nella formazione del numero dei complessi attivati da reagenti e prodotti, ci dice che la reazione diretta è tre volte più veloce della reazione inversa, per cui la reazione è spontanea verso destra e l'equilibrio sarà raggiunto con una concentrazione di prodotti maggiore di quella dei reagenti e cioè quando il

prodotto delle concentrazioni dei prodotti sarà tre volte il prodotto delle concentrazioni dei reagenti.
All'equilibrio la velocità della reazione diretta e quella della reazione inversa sono uguali:

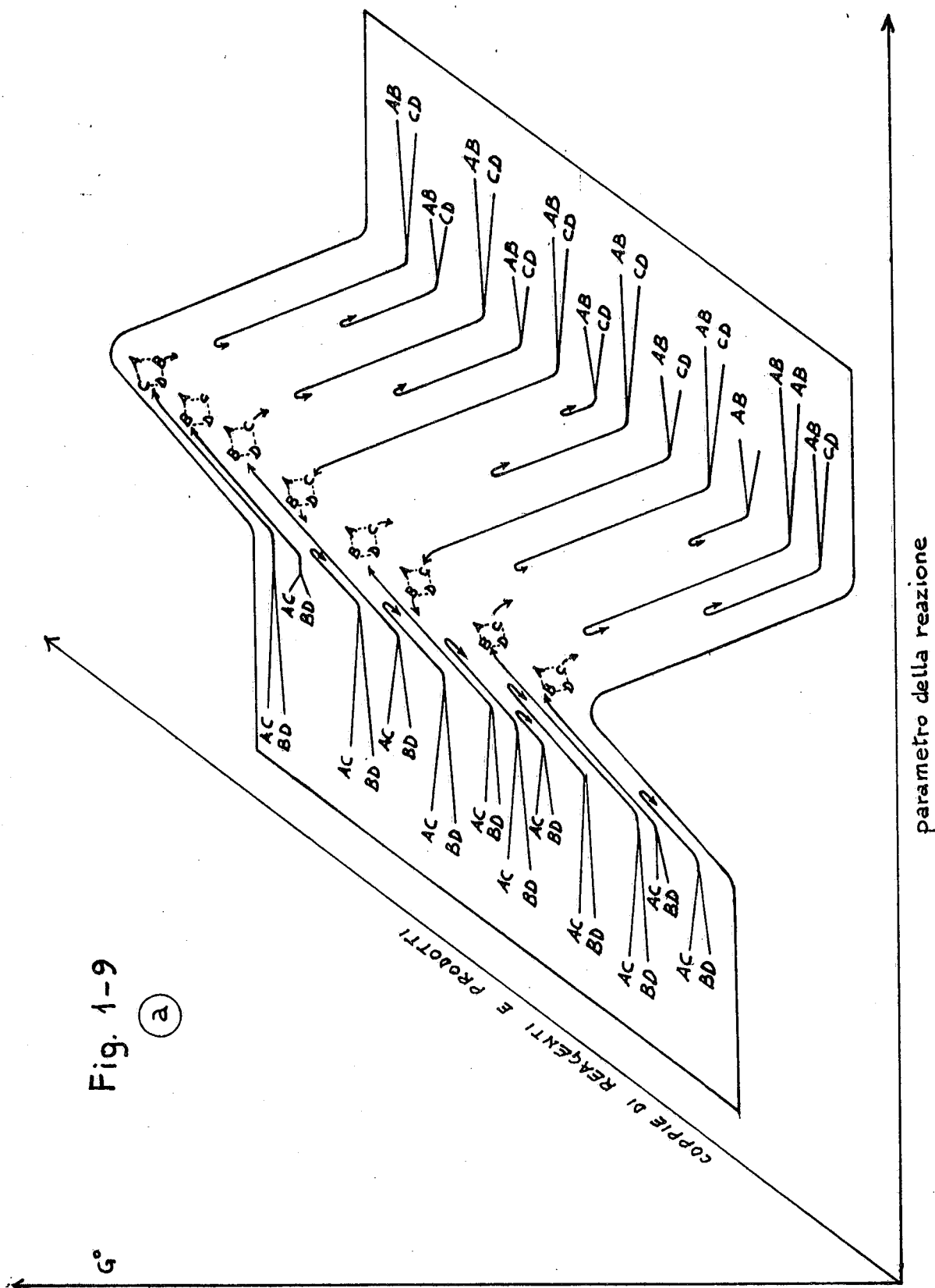
$$[AC] [BD] k_1 = [AB] [CD] k_2$$

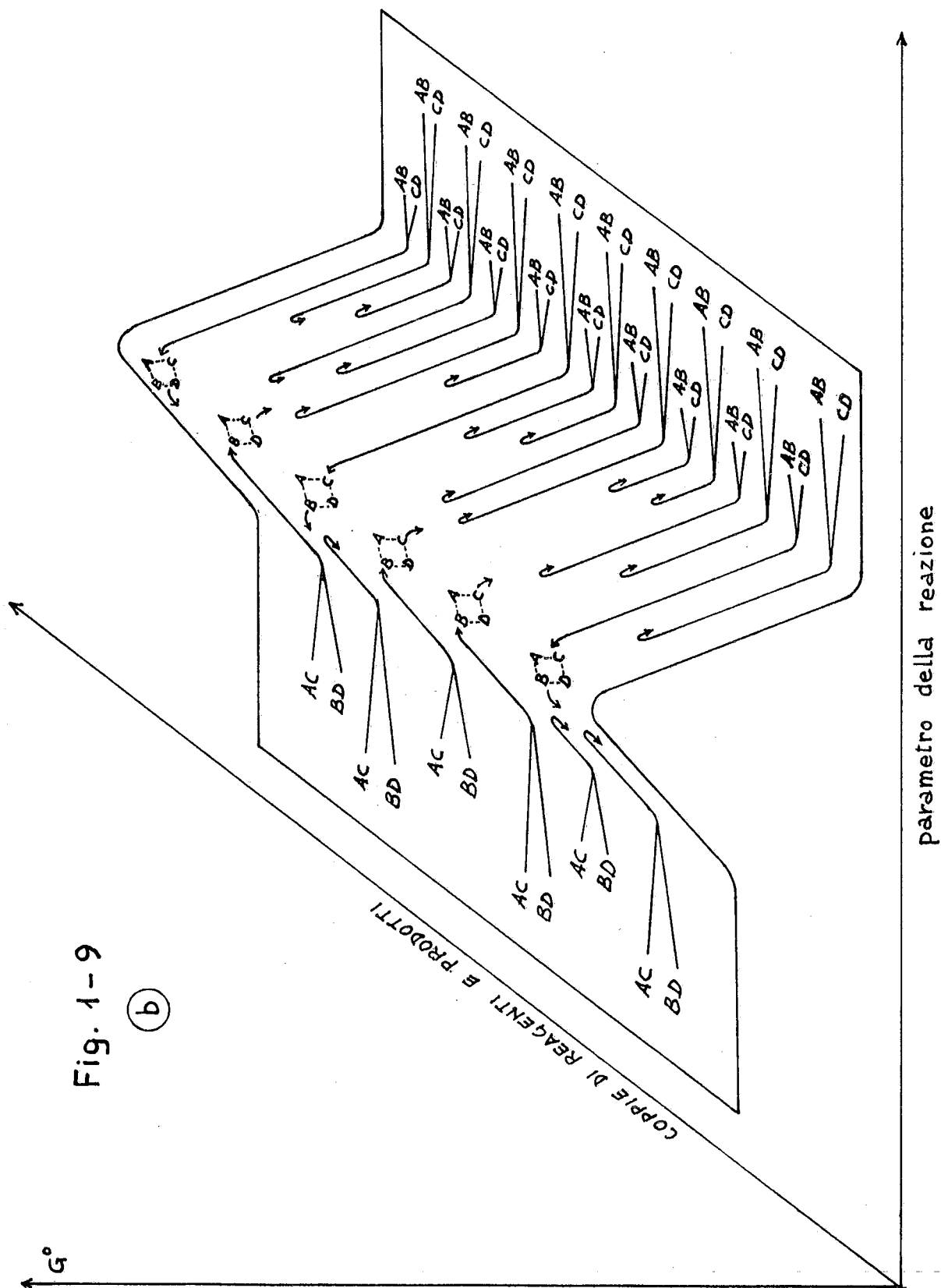
$$k_1 = 3 k_2$$

$$\frac{[AB] \cdot [CD]}{[AC] \cdot [BD]} = \frac{k_1}{k_2} = \frac{3}{1}$$

La figura 1-9b mostra la reazione quando ha raggiunto l'equilibrio dalle condizioni standard rappresentate in 1-9a.

Con il procedere verso destra, la reazione non è più in condizioni standard ed ha raggiunto l'equilibrio: ora la concentrazione dei reagenti è diminuita della metà (da 12 a 6 coppie di molecole) mentre quella dei prodotti è aumentata della metà (da 12 a 18 coppie di molecole), di conseguenza la velocità della reazione diretta è diminuita e quella della reazione inversa è aumentata, e sono ora uguali tra loro. Nell'unità di tempo arbitraria si ha la formazione di 3 complessi attivati dai reagenti e 3 dai prodotti. La figura mostra che anche in condizioni di equilibrio la barriera alla reazione diretta è minore di quella della reazione inversa e la loro differenza in valore assoluto rimane la stessa, nulla è cambiato da ciò che era in condizioni standard eccetto le concentrazioni relative dei reagenti e dei prodotti. Infatti, se non si cambia la T, la stabilità dei reagenti e dei prodotti non può essere cambiata, e quindi nemmeno la loro inerzia a reagire. All'equilibrio, la velocità della reazione diretta è uguale a quella della reazione inversa, perchè sono cambiate le concentrazioni dei reagenti e dei prodotti. L'esemplificazione data in figura di una reazione che parte dalle condizioni standard per raggiungere l'equilibrio, può essere utilizzata per qualsiasi reazione che, in condizioni diverse da quelle standard, proceda per raggiungere l'equilibrio.





Funzioni biologiche delle associazioni tra macromolecole e molecole nella cellula.

L'osservazione a livello molecolare di una cellula mostra che essa è costituita dall'associazione di macromolecole tra loro, le quali danno luogo a strutture sopramolecolari stabili, come i complessi di enzimi, la cromatina e gli organi subcellulari (mitocondri, ribosomi, reticolo endoplasmatico ecc.), le membrane (nucleari e plasmatiche). Il processo di associazione avviene anche tra proteine fibrose, come nel collagene, dove unità di tropocollagene sono parzialmente ed ordinatamente sovrapposte al fine di costituire fibre di collagene molto più lunghe della lunghezza dell'unità di tropocollagene. Successivamente all'associazione si formeranno per via enzimatica, legami covalenti intra ed interunità di tropocollagene. I due filamenti di deossi-polinucleotide che costituiscono la doppia elica del DNA, si associano con alta affinità e stabilità. Negli eucarioti il DNA è associato a proteine strutturali (istoni ed altre) formando strutture sopramolecolari dette cromosomi.

Nel metabolismo e nella sua regolazione intervengono proteine in genere globulari, capaci di associare specificamente e con alta affinità piccole molecole e macromolecole, svolgendo su esse la propria attività biologica: deposito, trasporto di piccole molecole, catalisi delle reazioni covalenti, regolazione e funzioni molto specializzate (contrazione muscolare, la coagulazione del sangue, l'associazione degli antigeni, ecc).

Associazione di proteine con altre molecole.

Le proteine hanno la capacità di legare altre molecole con altissimo grado di specificità e di affinità. Per queste proprietà si dice che le proteine hanno la capacità di "riconoscere" le molecole che legano (riconoscimento molecolare). Il prodotto di associazione tra le proteine ed altre molecole è detto complesso o complesso biologico e la molecola che si lega alla proteina in maniera reversibile è detta legante. Le proteine hanno la capacità di legare specificamente vari tipi di legante: ioni monoatomici (positivi e negativi) piccole molecole, molecole complesse e macromolecole (acidi nucleici, proteine, carboidrati). L'associazione di una proteina con un'altra molecola può formare un complesso molto stabile o un complesso che si forma e si dissocia frequentemente nelle condizioni cellulari. Il grado di stabilità del complesso è geneticamente determinato ed è in relazione alle funzioni che il complesso stesso svolge nella cellula. Un esempio di complesso proteina-legante stabile è dato da

enzimi con i gruppi prostetici. L'associazione tra apoenzima e gruppo prostetico è da considerarsi irreversibile nelle normali condizioni cellulari, perchè è richiesto che l'enzima mantenga costantemente il gruppo prostetico al fine di avere stabilità strutturale ed attività catalitica. Un esempio di complesso labile è dato dai coenzimi trasportatori che si associano reversibilmente agli enzimi. I coenzimi partecipano alla reazione accettando parti della molecola del reagente (substrato) quindi si dissociano dall'enzima per legarsi ad un altro e partecipano ad un'altra reazione. Un altro esempio di complesso labile è il complesso che si ottiene dall'associazione tra un enzima ed il suo effettore; esso è rapidamente reversibile al fine di poter regolare opportunamente l'attività catalitica dell'enzima.

In senso generale, nel metabolismo e nella sua regolazione sono coinvolte proteine che formano complessi stabili e labili con altre molecole, macromolecole od ioni.

Le proteine che partecipano al metabolismo ed alla sua regolazione includono:

- 1) Proteine di deposito (mioglobina, ferritina, ecc.)
- 2) Proteine di trasporto (albumina, transferrina, ecc.)
- 3) Proteine di trasporto regolate (emoglobina)
- 4) Proteine catalitiche (enzimi)
- 5) Proteine catalitiche regolate (enzimi regolati)
- 6) Proteine effettori di regolazione (ormoni, fattori di crescita, loro recettori cellulari, ecc.)

Le proteine, proprio per la loro capacità di riconoscimento molecolare e per altre funzioni ad esso collegate, entrano in ogni aspetto del metabolismo delle piccole molecole e delle macromolecole. Per il numero di specie e per le funzioni svolte le proteine sono il principale fenotipo. Le proteine (enzimi, fattori di riconoscimento e di trascrizione, proteine strutturali dei cromosomi), partecipano alla replicazione del patrimonio genetico (sintesi del DNA), alla sua espressione (sintesi di mRNA e proteine) ed al mantenimento della sua integrità (riparazione del DNA). L'azione delle proteine è completata dai riconoscimenti operati da sequenze complementari di basi puriniche e pirimidiniche. Questi riconoscimenti sono gli unici, tra quelli attualmente noti, non operati dalle proteine.

Struttura delle proteine e capacità di associazione specifica dei leganti.

Al fine di comprendere il meccanismo di formazione spontanea dei complessi proteina-legante che avviene ad alta velocità senza l'intervento di catalizzatori, è necessario osservare la struttura delle proteine.

Le proteine naturali sono polimeri costituiti da 20 aminoacidi diversi, cioè dei 20 aminoacidi codificati geneticamente. Proteine diverse sono costituite da sequenze diverse di aminoacidi. Le sequenze possono differire per pochi o molti aminoacidi, essere più o meno lunghe e mancare di una o più specie di aminoacidi. Le proteine globulari possono avere masse molecolari che variano da 10.000 ad alcuni milioni di D. Le proteine globulari con un'alta massa molecolare (in genere oltre 50kD), non sono costituite da un unico lungo polipeptide, ma da più polipeptidi che in genere non superano i 400 aminoacidi ciascuno. 400 aminoacidi corrispondono ad una massa molecolare di circa 48kD. Le proteine composte da più polipeptidi sono dette oligomeri, e subunità i polipeptidi che li costituiscono. Se le subunità sono polipeptidi identici, sono dette anche protomeri.

Monomero è la proteina costituita da un solo polipeptide. Proteine monomeriche ed oligomeriche hanno in genere forma globulare o comunque compatta tendente alla sfericità. Questa struttura risulta da ripiegamenti della catena polipeptidica che dispongono la maggior parte dei residui aminoacidici idrofobici nella parte interna della molecola, e vanno così a costituire il core idrofobico della proteina, mentre la quasi totalità dei residui aminoacidici carichi e polari è disposta sulla superficie. Il core idrofobico conferisce gran parte della stabilità alla struttura globulare, ed i gruppi carichi e polari sulla superficie la solubilità della proteina. Una o più parti della catena polipeptidica della proteina globulare può essere nella forma di struttura ripetitiva ed ordinata come l' α elica e la β struttura.

La quantità percentuale di α e β struttura presente in una proteina globulare varia da proteina a proteina; comunque queste strutture tipiche delle proteine fibrose vengono disposte opportunamente in modo che la proteina risulti globulare e compatta. La mioglobina è così compatta che nel suo interno c'è uno spazio pari al volume di due molecole di acqua (vedi fig.6-1).

La compattezza della proteina risulta dal fatto che i gruppi dei residui aminoacidici sono opportunamente disposti, l'uno rispetto a quelli vicini, in modo da lasciare pochi spazi liberi al fine di poter fare il numero più grande possibile di legami secondari (idrofobici, a H, ionici, forza di Van der Waals, vedere Tab. 2-1) e stabilizzare al massimo la struttura della proteina. La struttura delle proteine globulari (struttura terziaria) è stabilizzata oltre che da legami idrofobici posti all'interno della molecola, da legami a idrogeno ed ionici che si formano tra residui di aminoacidi polari e carichi di tratti adiacenti della catena polipeptidica. La struttura di proteine globulari è talvolta stabilizzata anche da legami covalenti (ponti -S-S- tra due cisteine). Ciò si verifica prevalentemente in

proteine che esercitano la loro funzione biologica fuori della cellula che le ha sintetizzate, e/o che subiscono processi di maturazione per azione di proteasi (es. enzimi digestivi). Queste proteine richiedono una stabilità maggiore per mantenere la loro conformazione naturale che tenderebbe a svolgersi (a denaturarsi) rapidamente in ambienti molto diversi da quelli del citoplasma e/o perchè hanno perso parti di polipeptide nell'attivazione per via proteolitica.

La struttura delle proteine risulta dalla sequenza degli aminoacidi (struttura primaria) che non è altro che la traduzione secondo il codice genetico, della sequenza delle basi del DNA del gene strutturale della proteina. Nella sequenza degli aminoacidi c'è l'informazione per far assumere quella determinata struttura, nel mezzo acquoso del citoplasma, attraverso un meccanismo automatico di autoassemblaggio. La singolarità della struttura delle proteine è che il polipeptide, pur avendo la possibilità di assumere un grande numero di conformazioni, ne assume una sola che risulta la più stabile nelle condizioni cellulari. Polipeptidi aventi struttura primaria identica costituiscono nello stesso mezzo proteine globulari di identica conformazione e quindi con identiche proprietà chimiche e fisiche.

Le proteine regolate possono assumere almeno due conformazioni diverse che sono molto simili e differiscono per poche kcal/mole (vedere cap.3). La proteina associa il legante in una particolare zona della sua superficie detta "sito di legame". Negli enzimi questo sito è detto sito attivo o sito catalitico ed il legante è detto substrato dell'enzima. In genere il sito è meno del 5% della superficie totale della proteina, perchè in generale le molecole legate sono molto più piccole della proteina. Risulta evidente che dimensioni del sito sono in relazione alle dimensioni della parte di molecola o di macromolecola con cui la proteina è capace di interagire. Il sito catalitico, oltre a legare il substrato(i) catalizza specificamente una reazione che interessa il substrato(i) (vedere cap. 4). Il sito di legame (e così il sito catalitico) è disposto sulla superficie della molecola formando una cavità più o meno profonda verso l'interno della molecola proteica stessa. In questa cavità, il legante è associato con alta specificità ed alta affinità (vedere fig. 2-2). Il sito di legame è costituito da residui aminoacidici della proteina, la disposizione spaziale, la stericità, la carica o polarità o idrofobicità di questi residui, costituisce una superficie con una ben definita geometria e su questa superficie una definita distribuzione di cariche (positive e negative) unitarie, parziali e zone senza carica. Geometria e distribuzione di cariche sono specifiche di ogni singola specie molecolare di proteina. La superficie del sito di legame e quella del legante che interagisce con esso combaciano perfettamente, combaciano su di esse anche le zone senza carica, mentre se su una data zona della superficie del legante è presente una carica di un certo segno, nella parte corrispondente del sito di legame, è presente una carica di segno opposto. Cioè, se il legante ha un gruppo carbossilico (gruppo con

una carica negativa), nel sito catalitico corrisponde una cavità capace di accoglierlo e un gruppo con al suo interno una carica positiva (unitaria, es. un gruppo aminico ionizzato; parziale, es. idrogeno di un ossidrile) che interagirà opportunamente con il gruppo carbossilico. Se il legame ha un gruppo idrofobico (senza carica), nel sito di legame corrisponde una cavità idrofobica per accoglierlo. Analoghe considerazioni si possono fare per i gruppi carichi positivamente del legante. Si parla così di complementarità di forma e di carica tra sito di legame e legante. La complementarità della carica tra sito di legame e legante è così definita: c'è complementarità quando la carica (unitaria o frazione di unità) di un atomo o gruppo atomico del sito di legame con quello spazialmente corrispondente del legante, sono di segno opposto e la loro somma dà un valore uguale o molto vicino a zero. I gruppi idrofobici non hanno carica e la loro complementarità è solo di forma (sterica). La precisione con la quale il sito di legame e quello del legante si complementano, determinano l'accuratezza del riconoscimento del legante da parte della proteina, e cioè il grado di specificità che la proteina ha verso il proprio legante. Ovviamente molecole di dimensioni maggiori o diverse da quelle del legante non possono essere accolte nel sito di legame, cioè non vengono riconosciute (come leganti) della proteina. L'altro contributo alla specificità di associazione della proteina con il legante è dato dalla complementarità della carica.

Se ammettiamo l'esistenza di due molecole di legante di forma identica, di cui una completamente senza cariche e l'altra con gruppi carichi con segno opposto rispetto a quelli del sito di legame della proteina con la quale il legante dovrà interagire, la proteina può accogliere ambedue le molecole di legante, ma potrà formare legami e quindi trattenere il legante carico, mentre l'altro legante si dissocierà dalla proteina. Quindi la proteina riconoscerà il legante per la sua forma e per la carica, polarità od idrofobicità dei suoi gruppi atomici.

La complementarità delle superfici di contatto tra sito di legame e legante, oltre ad essere responsabile della specificità di associazione, è anche responsabile della formazione delle interazioni secondarie (legami deboli) tra proteina e legante. Queste interazioni possono formarsi in numero sufficiente a conferire stabilità al complesso solo se un certo numero di atomi rispettivamente del sito di legame e del legante sono disposti alla distanza e con l'orientamento giusti per realizzare le interazioni secondarie. Dal numero dei legami e dalla forza degli stessi dipende l'affinità della proteina verso il legante.

Il sito di legame delle proteine (e così il sito catalitico degli enzimi) sono geneticamente determinati, cioè nella sequenza degli aminoacidi ci sono le informazioni per conferire alla proteina la struttura globulare, e, con l'assunzione della struttura, la formazione del sito di legame che non è altro che una specifica disposizione sulla superficie delle proteine di un certo numero di residui aminoacidici del polipeptide. A questa disposizione contribuisce tutta la molecola proteica, perchè la disposizione dei gruppi atomici che costituiscono i siti

di legame, la stabilità di questa disposizione, la possibilità di piccoli cambiamenti delle posizioni relative dei gruppi quando viene legato il legante, non potrebbero realizzarsi con una struttura molecolare più piccola, dati i limiti che impongono le dimensioni fisse degli atomi che sono uniti da legami covalenti che hanno anch'essi dimensioni e direzioni fisse.

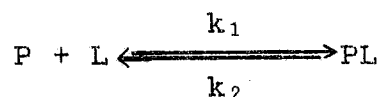
La proteina, assumendo la sua struttura globulare, forma il sito di legame, assume così la sua specifica funzione (deposito, trasporto, catalisi, ecc.); la funzione è persa con la perdita della struttura naturale della proteina (denaturazione della proteina). Alcune proteine di trasporto e molti enzimi, per associare il legante utilizzano un cofattore: ione metallico o molecola organica. La molecola organica è detta gruppo prostetico quando è permanentemente legata alla proteina. In alcuni enzimi, la molecola cofattore è detta coenzima trasportatore, ed è associato reversibilmente da più di un enzima e partecipa alternativamente alla catalisi delle rispettive reazioni. Si assume che l'associazione del cofattore da parte delle proteine abbia favorito positivamente l'evoluzione, perché con le 20 catene laterali degli aminoacidi codificati e con il meccanismo di espressione genica (sintesi di un polipeptide che si autoassembli a dare una struttura globulare con sito di legame) non si può realizzare un sito di legame per tutte le molecole necessarie per la cellula, ed in particolare per gruppi atomici, per i protoni e per gli elettroni. In genere, la proteina influenza la reattività del gruppo prostetico, infatti proteine diverse aventi lo stesso gruppo prostetico possono avere valori di affinità molto diversi per lo stesso legante, anche quando il legante interagisce solo con atomi del gruppo prostetico (es. Hb e Mb). Inoltre, reazioni diverse sono catalizzate da enzimi diversi che utilizzano un identico gruppo prostetico (es. enzimi a piridossal-fosfato).

L'associazione tra due proteine avviene tra due superfici complementari, prevalentemente idrofobiche quando le due proteine devono stare permanentemente associate per svolgere la loro funzione (es. subunità di una proteina oligomerica). L'idrofobicità delle superfici di associazione favorisce l'assemblaggio delle subunità perché le superfici idrofobiche, venendo escluse dall'acqua, tendono a disporsi di fronte. Successivamente, ad associazione avvenuta, gli altri tipi di legami deboli contribuiscono alla specificità ed alla stabilizzazione del complesso proteina-proteina. Se nelle condizioni cellulari il complesso proteina-proteina deve essere facilmente dissociabile al fine di svolgere la sua funzione, la legatura tra le due proteine può avvenire per superfici idrofobiche relativamente piccole e con pochi legami a H o ionici. Il ΔG di associazione è relativamente piccolo per cui il complesso è facilmente scisso dall'energia cinetica delle molecole a 37°C (vedere paragrafi seguenti).

Formazione dei complessi proteina-legante

La formazione dei complessi proteina-legante e proteina-macromolecola, si comporta come una reazione covalente per quanto riguarda le caratteristiche dell'equilibrio chimico (vedere cap. 1), dinamicità e dipendenza dalla temperatura e dalla legge di azione di massa (vedere figg. 2-1+2-5).

Per cui si può scrivere:



P = proteina

L = legante

k_1 = costante cinetica di associazione

k_2 = costante cinetica di dissociazione

La costante di equilibrio è anche detta costante di associazione e più frequentemente costante di affinità (K_a).

$$\frac{[PL]}{[P] \cdot [L]} = K_a \quad (M^{-1})$$

$$K_a = \frac{k_1}{k_2} \qquad \frac{1}{K_a} = K_d \quad (M)$$

Il valore della K_a è dato dal rapporto tra la concentrazione del complesso proteina-legante ed il prodotto delle concentrazioni della proteina libera e quella del legante, e si assume uguale al valore del rapporto della costante cinetica di associazione e quella di dissociazione del complesso PL.

La costante di affinità è comunemente usata come misura della stabilità del complesso proteina-legante. Maggiore è il numero e la forza dei legami che si formano tra P ed L, maggiore è la stabilità del complesso, e maggiore è il valore della costante di affinità, e quindi maggiore è il numero delle molecole sotto forma di complesso PL. Dal valore della costante di affinità dei complessi proteina-legante (come visto per la K_{eq} delle reazioni covalenti) si possono calcolare i valori di energia libera di formazione in condizioni standard dei complessi proteina-legante (tabella 2-2).

Velocità di formazione, velocità di dissociazione e stabilità del complesso proteina-legante.

Velocità di formazione del complesso proteina-legante.
Il percorso di una molecola in soluzione, dati gli urti con le altre molecole, è a caso secondo una linea spezzata (movimento Browniano). Tuttavia una piccola molecola (esempio un metabolita) nel citoplasma percorre $10\mu\text{m}$ (il diametro di una piccola cellula animale) in circa $2/100$ di secondo, che è circa lo stesso tempo che percorrere la stessa distanza in una soluzione acquosa. Per proteine di peso molecolare di 17.000 e 500.000 D, il tempo necessario per percorrere in acqua $10\mu\text{m}$ è rispettivamente circa $5/10$ di secondo e 3 secondi. Nel citoplasma la velocità di diffusione delle macromolecole è sicuramente inferiore, data la presenza di altre macromolecole e strutture subcellulari (citoscheletro, organelli subcellulari).

La diffusione è un meccanismo molto efficiente per muovere le molecole per piccole distanze. Tuttavia, la velocità di diffusione dipende dal quadrato della distanza da percorrere, per cui diviene molto lenta per lunghe distanze. Ad una molecola con alta velocità di diffusione occorrerebbero circa 160 anni per percorrere da un estremo all'altro una cellula nervosa lunga 1 metro. Ciò suggerisce che altri meccanismi mettano in comunicazione parti diverse di questo tipo di cellula. Anche il sistema circolatorio (cuore-arterie-vene) è un sistema per mettere in comunicazione cellule distanti che non potrebbero comunicare per semplice diffusione.

Il limite superiore della velocità di formazione dei complessi proteina-legante è dato dalla frequenza degli urti che queste molecole possono avere in soluzione. In questo caso, la reazione non ha energia di attivazione e le molecole P ed L incontrandosi, formano immediatamente il complesso. La velocità di queste reazioni è detta controllata dalla diffusione. I calcoli fatti considerando le restrizioni a cui va incontro una piccola molecola che deve incontrare una grande molecola in una particolare zona e secondo un certo orientamento, indicano una frequenza di collisione di $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Tuttavia i valori osservati sperimentalmente delle costanti cinetiche delle reazioni di associazione tra proteine e leganti naturali sono compresi tra 10^8 e $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (vedere tab. 2-4). I valori più alti delle costanti cinetiche di associazione sono vicini ai valori delle frequenze di incontro controllate dalla diffusione. Questi valori includono associazioni tra proteine e leganti costituiti da piccole molecole (zuccheri, aminoacidi, metaboliti, coenzimi trasportatori) ed anche da macromolecole (proteine ed acidi nucleici). I valori più bassi delle costanti di associazione si riferiscono ad associazioni tra leganti e piccole molecole o grosse molecole. Questi bassi valori sono spiegati considerando che il legante, se polare o carico, per associarsi alle proteine deve liberarsi dell'acqua (desolvatazione) a cui è legato con legami a H.

Un'altra causa della riduzione della costante della velocità di associazione tra proteina e legante è la formazione del complesso PL in due fasi (una successiva all'altra),

osservate sperimentalmente come se avvenissero in una fase sola. Cioè nella prima fase si ha la formazione del complesso con un alto valore di costante di velocità, successivamente la proteina ed/o il legante subiscono dei cambiamenti di conformazione che avvengono più lentamente (anche di 1000 volte) della prima fase e che perfezionano l'associazione tra P ed L formando altri legami deboli. Questi cambiamenti di conformazione sono importanti per l'attività biologica della proteina (specificità, trasporto, catalisi), tuttavia se le due fasi sono misurate come una sola, risulta una velocità di associazione molto più bassa di quella che si avrebbe se la reazione avvenisse solo con la prima fase. Probabilmente questi micro-aggiustamenti tra proteina e legante avvengono nella formazione della maggior parte dei complessi PL e l'energia libera spesa per realizzarli contribuisce a incrementare il ΔG° di attivazione.

La differenza esistente tra la velocità di reazione di formazione del complesso controllata dalla diffusione e quella delle velocità osservate sperimentalmente, indica che il semplice incontro, anche se con il giusto orientamento, non è sufficiente a formare il complesso proteina-legante e quindi dimostra l'esistenza di una barriera energetica alla formazione del complesso proteina-legante. Questa barriera energetica è l'energia libera di attivazione ($\Delta G^\circ \ddagger$) per la formazione del complesso ed è molto più piccola se confrontata con quella delle reazioni che interessano legami covalenti delle molecole biologiche (fig. 2-5).

In relazione alle specie molecolari (P ed L) che reagiscono, l'energia libera di attivazione per la formazione dei complessi proteina-legante varia (come indicato dai diversi valori delle K_1 della tabella 2-4), ed inoltre uno stesso valore di $\Delta G^\circ \ddagger$ (di associazione) può risultare da valori diversi di $\Delta H^\circ \ddagger$ (entalpia) e $\Delta S^\circ \ddagger$ (entropia). La barriera entalpica (energetica) alla formazione del complesso può essere data dalla energia richiesta per liberare il sito di legame e/o il legante dalle molecole d'acqua e dai cambiamenti conformazionali che avvengono in conseguenza della formazione dell'interazione tra proteina e legante. La barriera entropica alla reazione di associazione tra proteina e legante risulta dalle maggiori costrizioni che le due molecole hanno quando sono complessate rispetto a quando esse sono libere di muoversi separatamente. Ciò include: numero delle loro disposizioni nello spazio, movimento di singoli gruppi atomici, e per la proteina complessata ci può essere anche una ridotta libertà ai cambiamenti di conformazione, onde favorire la stabilità del complesso.

In fig. 2-2 sono schematizzati due casi estremi in cui una proteina associa un legante altamente idrofilo (polare e/o carico), un'altra un legante esclusivamente idrofobo. Possiamo assumere che la barriera entropica alla formazione dei due complessi possa essere circa dello stesso valore, mentre si assume che la barriera energetica (entalpica) per l'associazione del legante idrofilo sia superiore a quella del legante idrofobico per la spesa energetica richiesta per dissociare dal sito di legame e/o dal legante le molecole d'acqua.

La temperatura e le concentrazioni delle proteine e del

rispettivo legante sono i fattori che influenzano la formazione dei complessi proteina-legante. La temperatura rende possibile la diffusione e quindi l'incontro delle molecole e fornisce l'energia necessaria per superare la barriera di energia libera costituita dall'energia libera di attivazione. Incrementando la temperatura, la velocità di reazione aumenta perchè le molecole diffondono più velocemente in soluzione, quindi si incontrano più frequentemente e con maggiore energia. A temperatura costante, la velocità di formazione del complesso proteina-legante dipende dalla concentrazione dei reagenti, incrementando la concentrazione della proteina e/o del legante, aumenta la velocità di formazione del complesso perchè viene incrementata la frequenza dei loro incontri. In queste condizioni la velocità (media) di diffusione e l'energia (media) delle molecole rimangono costanti, essendo costante la temperatura; tuttavia, essendoci più molecole nello stesso spazio, esse dovranno spostarsi per distanze minori prima di incontrarsi, cioè gli incontri sono più frequenti. Da ciò l'incremento della velocità di reazione. La barriera energetica alla formazione dei complessi proteina-legante è piccola e l'energia cinetica delle molecole alla temperatura di 37°C (ma anche a 25°C) è sufficiente a superarla facilmente ed a garantire un'alta velocità di formazione dei complessi PL. Nella cellula, le barriere energetiche delle reazioni covalenti non sono superabili a 37°C, per cui tutte le reazioni covalenti sono catalizzate da enzimi (vedere cap.4).

Si può quindi generalizzare affermando che i complessi proteina-legante avvengano velocemente perchè alla loro formazione si oppone una piccola barriera di energia libera, e perchè in una soluzione a 37°C le molecole reagenti hanno sufficiente energia cinetica per superare tale barriera. Se una reazione di associazione ha una $k_1=10^7$ e si hanno concentrazioni iniziali di P ed L uguali ad 1M, la velocità di formazione del complesso è: $1M P \cdot 1M L \cdot 10^7 = 10^7 M s^{-1}$. All'inizio della reazione (quando ancora non è attiva la reazione inversa) con 1M L ed 1M P, 1M di complessi si forma un 10^{-7} S, un 1/10milionesimo di secondo. Nelle cellule, le concentrazioni della maggior parte dei leganti e delle proteine sono comprese tra $0,1 \mu M$ e $100 mM$ (fa eccezione l'acqua che è circa 55,5M). Se consideriamo una soluzione acquosa in cui siano presenti una proteina ed il rispettivo legante, ambedue in concentrazioni $10 \mu M$, risulta che con una $k_1=10^7$ la velocità con cui si formano i complessi è:

$$10^{-5}M P \cdot 10^{-5}M L \cdot 10^7 M^{-1} s^{-1} = 10^{-3} M \cdot PL s^{-1} = 1000 \mu M PL s^{-1}$$

All'inizio della reazione con $10 \mu M P$ e $10 \mu M L$, $1 \mu M$ di complessi si forma in 1/1000 di secondo. Confrontando le velocità rispettivamente calcolate con i reagenti P ed L 1M e $10 \mu M$ abbiamo la misura della riduzione della velocità di formazione del complesso P-L in relazione alla riduzione della concentrazione della proteina del legante. Passando da 1M a $10^{-5}M$, all'inizio della reazione la velocità di formazione di $1 \mu M$ di complesso P-L passa da 10.000

miliardesimi di secondo a 1 millesimo di secondo.

Velocità di dissociazione del complesso proteina-legante .
I valori delle costanti di velocità di dissociazione dei complessi proteina-legante sono centinaia e milioni di volte inferiori a quelli delle costanti di velocità di formazione del complesso. Se un complesso proteina-legante è presente in una soluzione in concentrazione $10\mu\text{M}$ ed ha una costante di velocità di dissociazione $k_2=10\text{ S}^{-1}$, si dissocierà con velocità:

$$10^{-5}\text{M PL} \cdot 10\text{ s}^{-1} = 10^{-4}\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$$

che corrisponde a $100\mu\text{M s}^{-1}$.

All'inizio della reazione di dissociazione con $[\text{PL}]=10^{-5}\text{M}=10\mu\text{M}$, $1\mu\text{M}$ di PL si dissocia in 1/100 di secondo. Se consideriamo una reazione di associazione che ha

$$k_1=10^{-7}\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}, k_2=10\text{ s}^{-1} \text{ e quindi una } K_a=10^6$$

$$\text{P}+\text{L} \longrightarrow \text{PL} \quad \frac{[\text{PL}]}{[\text{P}][\text{L}]} = 10^6\text{ M}^{-1} = 10^{12}\mu\text{M}^{-1}$$

partendo da concentrazione $10\mu\text{M}$ (10^{-5}M) per P ed L, si ha

$$\frac{9,999 \cdot 10^{-6}\text{M PL}}{3,163 \cdot 10^{-9}\text{M P} \cdot 3,163 \cdot 10^{-9}\text{L}} = 10^6\text{ M}^{-1} = 10^{12}\mu\text{M}^{-1}$$

$$10^{-5}\text{M P} \cdot 10^{-5}\text{M L} \cdot 10^{-7}\text{M}^{-1}\text{s}^{-1} = 10^{-3}\text{M s}^{-1} = 1000\mu\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$$

Questa è la velocità iniziale capace di formare $1\mu\text{mole}$ di complesso in 1/1000 di secondo, poichè con il procedere della reazione le concentrazioni di P ed L decrescono ed in conseguenza la velocità di reazione rallenta. L'equilibrio è raggiunto in meno di 20/100 di secondo. Dato l'alto valore di k_1 , la reazione di associazione è molto veloce, e dato l'alto valore di k_1 rispetto a k_2 ($k_1/k_2=10^6$) la P si trova quasi tutta ($9,999\mu\text{moli}$) sotto forma di complesso PL, solo $3,162 \cdot 10^{-3}\mu\text{moli}$ ($3,162\text{ nmoli}$), cioè meno di 1/3 di millesimo di quella complessata si trovano come P libera. Il complesso si dissocia continuamente con velocità:

$$9.99 \cdot 10^{-6}\text{M PL} \cdot 10\text{s}^{-1} = 9,99 \cdot 10^{-5}\text{M s}^{-1} = 99,9\mu\text{M s}^{-1}$$

Cioè le $9,99\mu\text{moli}$ di complesso PL presenti all'equilibrio si dissociano ogni 1/10 di secondo. 1/10 di secondo rappresenta la vita media del complesso PL in concentrazione $10\mu\text{M}$. Si parla di vita media perchè non tutti i complessi hanno lo stesso livello energetico e quindi alcuni si dissocieranno prima, altri dopo. Nonostante che la k_2 sia 10^6 volte inferiore alla k_1 , la velocità di dissociazione risulta essere alta, molto più alta (circa 10^8 volte) di quella delle reazioni covalenti. La concentrazione del complesso PL rimane costante perchè la

velocità di associazione e di dissociazione sono uguali.

$$3,16 \cdot 10^{-3} \mu\text{M} \cdot 3,16 \cdot 10^{-3} \mu\text{M} \cdot 10^{-7} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} = 99,9 \mu\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$$

All'inizio della reazione con $[P]=10\mu\text{M}$ ed $[L]=10\mu\text{M}$ 1 μmole di complessi si forma in 1/1000 di secondo, questi complessi rimarranno complessati 1/10 di secondo. Queste differenze di velocità permettono alla reazione di associazione di raggiungere rapidamente l'equilibrio. All'equilibrio, dato l'abbassamento della concentrazione di P e di L, i complessi si formano in 1/10 di secondo e si dissociano alla stessa velocità ed in quantità di 9,9 μmoli .

In condizioni di equilibrio, quando la concentrazione del complesso PL invece che 9,99 μM è 99,9 μM , la vita media del complesso è ancora 1/10 di secondo, mentre la quantità media dei complessi che si dissociano è aumentata di 10 volte.

La vita del complesso proteina-legante è determinata dalla costante cinetica di dissociazione, le quantità relative di proteina complessata e proteina libera dipendono

dal rapporto delle costanti cinetiche (k_1/k_2), cioè dalla

costante di affinità (K_a), e per un dato valore di K_a il numero dei complessi PL presenti all'equilibrio dipende dalla concentrazione di P ed L. Dato che le costanti cinetiche di associazione (k_1) hanno valori intorno a $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, in prima approssimazione si può assumere che il valore del rapporto $10^7/K_a$ sia vicino al valore della k_2 e quindi alla vita del complesso proteina-legante.

Consideriamo ora le particolari condizioni di equilibrio che si verificano nei liquidi biologici.

Una proteina con funzioni di trasporto transmembrana, ha una concentrazione ($10\mu\text{M}$) che rimane costante per tempi molto lunghi. La concentrazione nella membrana di queste proteine può essere anche 100 mM (Miller et al., J.Biol.Chem. 1983, 258, 13665).

Il legante in soluzione all'esterno della cellula (spazio tra cellula e capillari), ha una concentrazione ($10\mu\text{M}$) che rimane costante nel tempo, perchè sebbene il legante venga continuamente trasferito all'interno della cellula, esso viene continuamente rimpiazzato per via ematica con quello proveniente da altri distretti. La concentrazione di L è detta costante allo stato stazionario, per distinguerla dalla concentrazione costante delle condizioni di equilibrio, dove L non viene rimosso e ri-immesso nel sistema, cioè non si ha trasferimento di materia. In queste condizioni la proteina si trova nella forma complessata, in quantità maggiori rispetto alle condizioni di equilibrio termodinamico sopradescritte, perchè l'associazione è ora spinta da una non ridotta ($10\mu\text{M}$) concentrazione di L. In queste condizioni, la concentrazione di P libera è minore di $10^7 \mu\text{M} = 10^{-1} \text{ nM}$.

Consideriamo che la proteina di trasporto, per operare il trasporto debba cambiare posizione all'interno della membrana (traslocazione) e quindi rilasciare il legante che verrà associato ad un'altra proteina di membrana o che entrerà direttamente nel citoplasma. Nelle condizioni sopra indicate le proteine di trasporto saranno nella quasi totalità complessate, parte di esse saranno in corso di traslocazione, parte in fase di dissociazione del legante

all'interno della cellula, e quelle che traslocando indietro esporranno nuovamente all'esterno il sito di legame, associeranno rapidamente una nuova molecola di legante per ricominciare il trasporto.

La velocità di riformazione dei complessi, considerando una concentrazione di P libera di 10^{-10}M risulta:

$$10^{-10}\text{M P} \cdot 10^{-5}\text{M L} \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} = 10^{-8}\text{M s}^{-1}$$

Le proteine P libere (10^{-10}M) si complessano con L alla velocità di 10^{-10}M ogni 1/100 di secondo. Quindi, una proteina di trasporto appena trasloca indietro per esporsi ai liquidi extracellulari in 1/100 di secondo, sarà nuovamente complessata con L. In questo modo la concentrazione di 10^{-10}M di proteina libera sarà mantenuta costante (stato stazionario).

Data l'alta dinamicità dell'equilibrio le proteine libere non saranno mai le stesse.

Analogo ragionamento si può fare per le proteine enzimatiche, L'enzima legge reversibilmente il substrato (legante), quindi il complesso subisce dei cambiamenti di conformazione, il legante è trasformato in prodotto e questo si dissocia dall'enzima che riassume la conformazione primitiva ed è pronto ad associare il nuovo substrato. Nei liquidi biologici, la concentrazione dei metaboliti substrati di enzimi è mantenuta costante, per cui una larga frazione di enzima è costantemente complessata con il substrato.

La conoscenza dei valori delle costanti cinetiche delle reazioni di associazione tra proteina e legante permette di fare alcune generalizzazioni (vedere tabella 2-4; notare che non sono presi in considerazione i valori relativi alla tripsina-inibitore data la particolarità del complesso).

Indipendentemente dal tipo di proteina (deposito, trasporto, catalitica) la k_1 è molto alta, con una variabilità massima di 100 volte (da $2,2 \cdot 10^8$ a $2,4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) tra le diverse proteine; la k_2 è notevolmente più bassa (minimo 260 volte) della k_1 ed ha una maggiore variabilità (da 1,5 a $1 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$).

Il rapporto k_1/k_2 , cioè la K di affinità per il legante, è molto alto per la mioglobina, per le proteine di legame e per molti enzimi.

La Natura ha favorito la selezione di proteine capaci di associare rapidamente e con alta affinità il legante. Lo scopo di questa selezione può essere interpretato considerando che l'attività biologica è la formazione del complesso stesso (proteine di deposito) o è dipendente da esso (trasporto, catalisi, ecc.); inoltre l'alta velocità di formazione dei complessi è importante per proteine come quelle di trasporto transmembrana e gli enzimi che svolgono una funzione ciclica eliminando dalla soluzione molecole di legante e riassociandone nuove. L'alta affinità della proteina verso il legante mantiene costantemente complessata, e quindi in funzione, la maggior parte delle molecole proteiche. La sintesi di una molecola proteica costa molta energia, una proteina con base K_a sarebbe uno spreco perchè molte molecole di tale proteina sarebbero costantemente libere (dal legante) e quindi non in funzione.

La variabilità della k_2 osservata all'interno e tra i due gruppi, proteine di trasporto ed enzimi, si ipotizza che sia in relazione ai meccanismi diversi, più o meno complessi, operati dalle proteine per svolgere la loro funzione biologica. Il complesso proteina-legante deve avere una vita sufficientemente lunga da permettere alla proteina di operare, od iniziare ad operare, la sua attività sul legante. Le proteine di trasporto di leganti attraverso la membrana, hanno valori di k_2 molto bassi, in genere più di 10.000 volte rispetto alle k_1 , ed in genere vicini o anche superiori a quelli delle velocità di trasporto del legante attraverso la membrana. Si è osservato che la velocità di dissociazione del complesso è superiore (anche di 50 volte) alla velocità di trasporto transmembrana del legante, per cui si ammette che la stabilità dei complessi sia sufficiente a permettere l'inizio del meccanismo di trasporto (traslocazione), meccanismo che poi è completato in tempi più lunghi dalla stabilità del complesso. Analogamente si può speculare che per alcuni enzimi il valore della k_2 sia un compromesso tra stabilità e possibilità di cambiare conformazione del complesso al fine di operare la catalisi. Un legante troppo affine all'enzima può essere un impedimento ai cambiamenti di conformazione della proteina complessata.

Stabilità dei complessi proteina-legante.

Nei sistemi biologici le reazioni di associazione semplice tra una proteina ed un legante, che portano alla formazione di complessi velocemente dissociabili nelle condizioni cellulari, hanno valori di K_a compresi tra circa 10^2 e 10^{10} litri/mole, che corrispondono a valori di energia libera di formazione del complesso (ΔG°) rispettivamente tra -2,84 e -14,19 kcal/mole (vedere tab.2-2). Anche le proteine ed i leganti che hanno i valori più bassi di affinità come $K_a = 10^2$, hanno la loro reazione di associazione fortemente spostata verso la formazione del complesso. All'equilibrio raggiunto partendo dalle condizioni standard, la quasi totalità della proteina è nella forma complessata (1,85M), solo 1 molecola su 14 si trova nella forma libera (tabella 2-2). Il complesso, pur avendo un G° di formazione di sole -2,84 kcal/mole, è così stabile che la velocità di dissociazione di una mole di complesso è 100 volte inferiore a quella della sua formazione da una mole di P ed una di L. Per avere un alto rapporto tra complessi PL ed P libera sono necessari alti valori di affinità corrispondenti a $K_a \geq 10^6$ M⁻¹ (PL/L \geq 1418). Un alto valore di rapporto PL/L è necessario quando le molecole di P e/o L sono presenti nella cellula in poche copie (bassissime concentrazioni). Una cellula di mammifero (ad esempio di fegato umano) ha un volume di circa 2000 μm^3 e se una proteina è presente nella cellula con una sola molecola la sua concentrazione è circa 10^{-12} M (pM = picomolare)
 1 litro \equiv 10cm³ \equiv 10¹⁵ μm^3
 $10^{15} : 2 \cdot 10^3 = 5 \cdot 10^{11}$ numero di cellule/litro
 essendoci una molecola/cellula $5 \cdot 10^{11}$ è anche il numero di molecole che sono presenti in un litro.
 Una soluzione 1M contiene $6 \cdot 10^{23}$ molecole (numero di Avogadro).

$5 \cdot 10^{11} : 6 \cdot 10^{23} = 0,8 \cdot 10^{-12} \text{ M}$ che si approssima a 10^{-12} M .
 $10 \text{ molecole/cellula} \equiv \text{concentrazione cellulare: } 10^{-11} \text{ M}$.
 $10^4 \text{ molecole/cellula} \equiv \text{concentrazione cellulare: } 10^{-8} \text{ M}$.

Una proteina presente nella cellula in 10^4 copie (10^{-8} M) ed un legante presente nella cellula in 10^7 copie (10^{-5} M) si associano con una $K_a = 10^6 \text{ M}^{-1}$.

Il rapporto PL/L può essere calcolato :

$$\frac{[PL]}{[P] \cdot [L]} = K_a = 10^6$$

$$\frac{[PL]}{[P]} = K_a \cdot [L] = (10^6 \text{ M}^{-1}) \cdot (10^{-5}) = 10$$

Per ogni molecola di P libera ce ne sono 10 complessate con L.

Se l'affinità tra P ed L fosse maggiore con $K_a = 10^9 \text{ M}^{-1}$ per ogni molecola P libera ce ne sarebbero 10.000 complessate, cioè tutte le molecole di P (meno una) sarebbero sottoforma di complesso PL.

Se P è presente nella cellula come singola copia (ad esempio un cromosoma che con una sua proteina si lega al fuso mitotico) ed L in 100 copie (si assume che sul fuso ci siano almeno 100 proteine identiche capaci di associare il cromosoma con la stessa affinità).

$[P] = 10^{-12} \text{ M}$ $[L] = 10^{-10} \text{ M}$
 $K_a = 10^{23}$ (calcolata, vedere testo)

$$\frac{[PL]}{[L]} = (10^{23} \text{ M}^{-1}) \cdot (10^{-10}) = 10^3$$

Si può assumere che una volta che P (cromosoma) si è associato ad L (fuso mitotico) è molto improbabile che si dissocia da esso.

La stabilità del complesso proteina-legante dipende dalle interazioni che si formano tra le due molecole. Ci si può domandare perchè una molecola carica o polare preferisca legarsi al sito di legame della proteina, dove fa un numero di legami secondari che può essere identico a quello che faceva con l'acqua, apparentemente senza avere un beneficio di energia libera. La differenza è nella instabilità dell'associazione tra il legante e le molecole dell'acqua e la stabilità dell'associazione con le proteine.

Se assumiamo che il legante formi 8 legami a idrogeno con l'acqua, questi verranno spezzati dall'agitazione molecolare in tempi diversi, raramente simultaneamente. Anche se l'interazione con le molecole d'acqua sarà continua nel tempo, le molecole di acqua con cui interagisce il legante vengono continuamente sostituite da altre. Quando il legante è associato alla proteina, per dissociarsi da essa è richiesto che tutti gli otto legami siano spezzati simultaneamente, e perciò è richiesta nello stesso momento

una maggiore quantità di energia, circa otto volte maggiore di quella richiesta per rompere un singolo legame debole. Quindi, a differenza dei legami a H che il legante forma con l'acqua, i legami a H che si formano tra proteina e legante cooperano a mantenere il legante associato alla proteina. Si assume che ciò sia un fattore importante per la stabilità del complesso proteina-legante. Inoltre l'acqua, per formare il massimo numero di legami a idrogeno con se stessa, tende ad escludere qualsiasi soluto, anche se molto solubile in acqua. Questo effetto è esaltato quando la molecola è parzialmente o totalmente idrofobica. Quindi se il legante, oltre ad interagire con la proteina con legami H e salini può formare legami idrofobici, la stabilità del complesso è ulteriormente incrementata.

A proposito va ricordato che una molecola altamente idrofila come uno zucchero (glucosio) ha 7 atomi di H legati con atomi di carbonio che possono interagire idrofobicamente o con forze di Van der Waals o con gruppi idrofobici nel sito di legame. Per almeno una proteina ciò è stato dimostrato. La stabilità del complesso proteina-legante è in relazione diretta all'energia libera (ΔG) perduta con la formazione dei legami deboli tra proteina e legante. Questa energia (energia libera di formazione del complesso) deve essere fornita nuovamente al complesso al fine di poterlo dissociare. Poichè l'energia libera di attivazione per la formazione del complesso è molto piccola, l'energia libera sufficiente a dissociare il complesso corrisponde a poco più dell'energia libera di formazione del complesso stesso (figg. 2-3 e 2-4). Questa energia è fornita dall'agitazione delle molecole provocata dal calore. Ci si può domandare come un complesso proteina-legante dotato di alta stabilità possa dissociarsi di nuovo. Tuttavia le molecole in soluzione, a causa degli urti con le altre molecole in soluzione, assumono energia sotto forma di vibrazioni che hanno frequenze molto alte (10^{12} - 10^{13} s⁻¹ a 25°C). Data la casualità degli urti con le altre molecole, l'energia della vibrazione di una molecola molto grande come il complesso PL, non si distribuisce ugualmente su tutti i suoi atomi. Di conseguenza atomi diversi possono avere gradi diversi di vibrazioni, oscillazioni, rotazioni e distribuzione di elettroni. In questo modo, costantemente su una certa frazione di molecole di complessi PL, gli atomi del legante e della proteina interagenti tra loro possono assumere valori energetici molto più alti del loro valore medio e causare un indebolimento delle reciproche interazioni fino a causare la dissociazione del complesso. Inoltre il complesso PL, essendo un'unica molecola in soluzione, è in uno stato più ordinato rispetto a quello delle due sue componenti P ed L libere. Quindi, in genere, la dissociazione del complesso è favorita perchè procede con un aumento di entropia. L'energia cinetica media a 37°C è 0,92 Kcal/mole, e poichè i livelli massimi di energia cinetica e/o di vibrazione che possono raggiungere le molecole non variano se non varia la temperatura, i complessi PL si dissociano con velocità che hanno valori inversi alla stabilità del complesso stesso. Quindi minore (perchè di segno negativo) è il valore dei G° di formazione del complesso, maggiore è il valore della K_a e più lunga è la vita del complesso stesso.

Relazione tra energia libera di formazione del complesso proteina-legante ed il numero dei legami deboli che lo stabilizzano.

Il ΔG° della reazione di associazione dei complessi PL risulta dalla somma dell'energia libera rilasciata nella formazione dei singoli legami deboli che stabilizzano il complesso stesso.

Mediante analisi cristallografiche con i raggi X è stato possibile definire la struttura tridimensionale di alcuni complessi proteina-legante. La definizione di queste strutture ha permesso di conoscere la disposizione spaziale, la natura ed il numero delle interazioni esistenti tra gli atomi della proteina e quelli del legante (fig. 2-6. a,b,c,d). Inoltre di queste proteine si conoscono mutazioni, varianti naturali o sperimentali, che differiscono tra loro per la mancanza o per la sostituzione nel sito di legame di uno o più aminoacidi, i cui residui sono responsabili della formazione di legami deboli con il legante. Di questa proteina, naturale e mutata, si è misurata accuratamente la K_a , e dalla differenza delle rispettive K_a è stato possibile calcolare il valore del ΔG° di 1 o 2 legami a H ed idrogeno-salini. Il numero dei complessi di cui si conosce la struttura tridimensionale è limitato a poche proteine, ed i leganti sono prevalentemente polari, per cui i legami deboli presi in considerazione sono esclusivamente a H o salini. Tuttavia è stato possibile costruire un grafico (fig. 2-6 e) che pone in relazione il numero delle interazioni esistenti tra proteina e legante con il G° di formazione del complesso P-L, e quindi anche con le rispettive K_a .

Il grafico mostra che la perdita di un residuo aminoacidico del sito di legame, responsabile della formazione di un legame a H o salino con il legante, causa un aumento del

ΔG° di associazione di circa 1Kcal/mole.

Da ciò risulta che questa sia la forza media di un legame a idrogeno ed idrogeno-salino al netto dell'energia spesa per liberare il legante (che è la stessa molecola per la proteina naturale e quella mutata dalla molecola d'acqua.

Inoltre si è dedotto che sia sufficiente l'energia di pochi legami deboli per conferire stabilità al complesso PL. 3 legami ad H sono responsabili di una $K_a=10^2$ e l'energia media di 1,5 legami a H fa aumentare la K_a di 10 volte.

Una reazione di dissociazione con $K_a=1$ indica che non c'è nessuna differenza di energia libera tra P ed L liberi e PL complessato e che la costante cinetica della reazione diretta e di quella inversa ha lo stesso valore. Quindi i complessi PL si formano con la stessa velocità con cui si dissociano. Sappiamo che i complessi proteina-legante hanno alte velocità di formazione, da ciò si deduce che i complessi PL con $K_a=1$ hanno una vita brevissima

($10^{-6}+10^{-7}$ secondi). Il grafico di fig. 2-6 conferma questa ipotesi. Il grafico che ha un andamento lineare e per estrapolazione dei dati incontra l'origine degli assi cartesiani formando con essi un angolo di 45° , mostra che una reazione di associazione con $K_a=1$ non causa liberazione di energia libera ($\Delta G^\circ=0$) e quindi apparentemente non si formano legami a H. Tuttavia, una

velocità di dissociazione del complesso uguale a quella della sua formazione, non esclude che il legante formi uno o più legami a H (od altri tipi di interazioni) con il sito di legame. Essa indica che i legami che si formano liberano complessivamente una quantità di energia libera uguale a quella richiesta al legante per liberarsi dalle molecole d'acqua e per superare la barriera data dall'entropia negativa per la formazione del complesso.

L'esistenza di complessi PL stabili che si formano in reazioni di associazione con $K_a=1$ sarebbe possibile solamente con un'alta barriera di energia libera tra P ed L liberi ed il loro complesso PL, in altre parole ad una reazione di associazione molto lenta e quindi ad una altrettanto lenta reazione di dissociazione. Tuttavia ciò non sembra essere il caso dei complessi proteina-legante osservati in natura (tabella 2-5) dove le k_1 di associazione hanno alti valori.

L'analisi comparativa dei K_a dei complessi proteina-legante (tabella 2-5) indica che i complessi meno stabili hanno $K_a > 10^2$, che corrisponde ad un ΔG° di circa 3 Kcal/mole, cioè all'energia netta di 3 legami a H. Da ciò si è dedotto che complessi PL con ΔG° di associazione inferiore alle 3 Kcal/mole, non abbiano stabilità sufficiente a permettere funzioni biologiche come catalisi, trasporto o deposito del legante.

Alcune considerazioni sul significato della variazione di energia libera standard nelle reazioni covalenti e nelle reazioni di formazione dei complessi proteina-legante.

Il valore dell'energia libera standard di una reazione covalente come quello della formazione del complesso proteina-legante risulta dalla differenza tra la variazione di energia libera standard dei prodotti e quella dei reagenti. Esso quindi dà la misura della differenza di stabilità termodinamica esistente tra prodotti e reagenti. La differenza di stabilità tra prodotti e reagenti è indicata anche dalla costante di equilibrio della reazione. I due valori sono posti in relazione dall'equazione:

$$\Delta G^{\circ} = -RT \ln K_{eq}$$

Il significato attribuito al ΔG° di reazione è quindi identico sia per le reazioni covalenti che per quelle di formazione dei complessi proteina-legante. Se prendiamo in considerazione la velocità con cui viene raggiunto l'equilibrio, la reazione covalente e la reazione di formazione del complesso proteina-legante si differenziano molto. La reazione covalente ha una velocità in genere molto bassa, trascurabile se comparata con le velocità richieste per il normale funzionamento del metabolismo cellulare, mentre le reazioni di formazione dei complessi proteina-legante hanno, se confrontate con quelle delle reazioni covalenti, velocità molto più alte (anche fino a 10^{14} volte). La ragione di questa differenza sta nel fatto che i legami covalenti sono raramente spezzati a 37°C , per cui le molecole dei reagenti difficilmente perdono la loro integrità strutturale. La forza dei legami covalenti è responsabile dell'alto valore di energia libera di attivazione delle reazioni covalenti (vedere Cap. 1). L'energia libera di attivazione delle reazioni covalenti tra metaboliti cellulari ha sempre un valore tale che molto raramente nei sistemi biologici vengono formati complessi attivati capaci di evolvere in prodotti. Infatti tutte le reazioni covalenti, anche le più veloci, se necessarie alla vita della cellula, sono catalizzate da enzimi al fine di farle procedere con velocità compatibili con le richieste energetiche e sintetiche della vita. Quindi bisogna assumere che i composti (metaboliti) presenti nei sistemi biologici, anche se termodinamicamente instabili, cioè pur essendo essi reagenti con altri metaboliti cellulari di una o più reazioni covalenti, sono cineticamente inerti perchè le reazioni a cui possono partecipare hanno energia libera di attivazione insuperabile alle temperature dei sistemi biologici. A causa della forza dei legami covalenti, cioè delle barriere energetiche costituite dall'energia di attivazione delle reazioni covalenti, i metaboliti cellulari sono composti inalterabili sia che essi siano reagenti per reazioni endoergoniche, esoergoniche o all'equilibrio in condizioni standard. La reazione di formazione dei complessi proteina-legante hanno velocità molto più alte delle reazioni covalenti, perchè l'energia libera di attivazione per la formazione del

complesso ha un basso valore, e da ciò l'alta velocità di formazione dei complessi proteina-legante. Il complesso proteina-legante assume stabilità in relazione al numero ed alla forza dei legami deboli che si formano nel sito di legame tra proteina e legante. La somma dell'energia libera netta ceduta dai singoli legami dà il valore del ΔG° di formazione del complesso (tab. 2-2) e cioè la misura della stabilità termodinamica del complesso. Il valore del

ΔG° dà anche la misura dell'inerzia a dissociarsi del complesso proteina-legante, perchè la velocità di dissociazione del complesso dipende dal valore dell'energia libera di attivazione per la dissociazione del complesso (ΔG^\ddagger) e questo valore, essendo il ΔG^\ddagger della reazione di associazione (cambiato di segno) relativamente piccolo, è molto vicino a quello del ΔG° di formazione del complesso cambiato di segno, quindi positivo. Se confrontiamo l'andamento energetico di una reazione covalente e di una reazione di formazione del complesso proteina-legante aventi rispettivamente gli stessi valori di ΔG° di reazione e di formazione (fig. 2-5), risulta evidente che la differenza tra le due reazioni è nei rispettivi valori dell'energia libera di attivazione. Nelle reazioni covalenti, l'energia di attivazione per la reazione diretta e per quella inversa, è sempre sufficientemente alta da costituire una barriera superata raramente nelle condizioni presenti nei sistemi biologici.

Nelle reazioni di formazione dei complessi proteina-legante, l'energia libera di attivazione ha in genere un valore molto basso nella reazione diretta, per cui la proteina ed il proprio legante sono molto reattivi, cioè si associano con velocità molto alte. I complessi proteina-legante che hanno la capacità di dissociarsi spontaneamente nella cellula, hanno valori di ΔG° di formazione tra circa -3 e -14 kcal/mole. Questi complessi si dissociano con velocità che possono essere molto inferiori a quelle della loro formazione (ad es. 10^6 volte inferiori, come nella reazione tra mioglobina ed O_2), tuttavia le velocità di dissociazione dei complessi risultano sempre molto superiori a quelle delle reazioni covalenti.

La reazione di idrolisi dell'urea ad ammoniaca ed anidride carbonica ha circa 30 Kcal/mole di energia di attivazione. Mediante l'azione di un enzima specifico l'energia di attivazione viene ridotta a circa 11 Kcal/mole, la velocità di reazione viene aumentata di circa $5 \cdot 10^{14}$ volte e di ugual valore aumenta la velocità della reazione inversa (anche se la reazione è catalizzata la sua K_a non cambia).

11 Kcal/mole corrisponde a circa l'energia di attivazione necessaria a dissociare complessi molto stabili con costanti di dissociazione molto piccole. $K_a = 10^{-6} \div 10^{-7}$ corrispondenti a ΔG° di dissociazione circa +10 Kcal/mole; il ΔG^\ddagger di dissociazione risulta circa +11 Kcal/mole, cioè è aumentato di 1 Kcal/mole che abbiamo assunto come valore della ΔG^\ddagger della reazione diretta. Quindi i complessi proteina-legante hanno velocità di formazione molto alte, solamente $10 \div 1000$ inferiori alla velocità di diffusione delle molecole. La velocità di dissociazione dei complessi, sebbene possa essere anche 10^7 volte inferiore a quella di formazione del complesso, rimane sempre molto alta,

superiore (anche di 10^{14} volte) a quella di una reazione covalente.

Nei sistemi biologici, la reazione di formazione dei complessi proteina-legante, raggiunge molto rapidamente l'equilibrio, ed una volta raggiunto, lo mantiene con alta dinamicità, cioè le velocità della reazione diretta ed inversa sono molto alte; mentre la reazione covalente non all'equilibrio, non lo raggiunge rapidamente a meno che non sia catalizzata da un enzima. Se la reazione covalente è all'equilibrio, questo equilibrio è dinamico solo se si considerano tempi lunghi rispetto ai tempi richiesti dal metabolismo cellulare.

Questo vuol dire che se osserviamo a 37°C una singola molecola costituita solo da legami covalenti, vedremo che essa rimane tale per un tempo lunghissimo (mesi, anni), mentre se osserviamo una molecola di complesso proteina-legante che si è formata liberando energia libera con valori tra -3 e -14 kcal/mole, vedremo che essa si dissocia in tempi che sono compresi tra frazioni di secondo e minuti.

La relativamente bassa barriera di energia libera che si frappone alla formazione del complesso PL non permette la formazione di complessi stabili con ΔG° di formazione $= 0$ ($K_a=1$), nè tantomeno di complessi con ΔG° di formazione > 0 ($K_a > 1$), perchè nel primo caso il complesso si dissocia con la stessa velocità con cui si forma, e nel secondo con velocità superiore a quella. Mentre nelle reazioni covalenti, la presenza di un'altra barriera di energia libera ($\Delta G^{\circ \ddagger}$ di attivazione), cioè di inerzia a reagire, nei due sensi della reazione permette l'esistenza di prodotti di reazione che hanno, rispetto ai reagenti, lo stesso contenuto di energia libera ($K_{eq}=1$, ΔG° di reazione $= 0$) di composti con contenuto superiore ($K_{eq}=1$, ΔG° di reazione > 0). I prodotti delle reazioni covalenti non torneranno velocemente a formare reagenti perchè, anche se i legami formati nella reazione sono più deboli di quelli dei reagenti, essi sono ancora troppo forti per essere spezzati dall'energia cinetica delle molecole a 37°C . Da ciò risulta che anche le molecole e macromolecole sintetizzate endoergonicamente nelle cellule sono tutte dotate di spontaneità verso la loro degradazione, ma sono altamente inerti, cioè stabili a 37°C (se non intervengono gli enzimi), altrimenti gli organismi viventi non potrebbero esistere come tali.

Per avere complessi proteina-legante con inerzia a dissociarsi comparabile all'inerzia a reagire delle reazioni covalenti, occorre che il complesso abbia un G° di formazione di almeno -23 kcal/mole (fig.2-5 e) a cui corrisponde una $K_a = 10^{16}$, cioè un $\Delta G^{\circ \ddagger}$ di associazione $\geq +24$ Kcal/mole. Questi complessi, una volta che si sono formati, sono da considerarsi indissociabili e rimangono tali, se le condizioni in cui si sono formati non vengono modificate.

Sommario:

Le reazioni covalenti e le reazioni di formazione di complessi proteina-legante aventi lo stesso valore di ΔG° di reazione, e quindi lo stesso valore di K_{eq} ,

all'equilibrio hanno lo stesso rapporto del prodotto delle concentrazioni dei prodotti sul prodotto dei reagenti. Per ambedue i tipi di reazione il ΔG° di reazione indica la stabilità del prodotto/i di reazione rispetto ai reagenti, e quindi il punto di equilibrio della reazione. Maggiore è la stabilità dei prodotti, maggiormente spostata verso destra è sia la reazione covalente che quella di formazione del complesso.

Le reazioni differiscono profondamente nella velocità della reazione diretta (esoergonica), che è sempre velocissima nelle reazioni di associazione tra proteina e legante, mentre nelle reazioni covalenti è molto lenta e quindi è considerata nulla per le funzioni biologiche. La reazione inversa (endergonica) è sempre più lenta di quella diretta sia nelle reazioni di dissociazione dei complessi PL che nelle reazioni covalenti. Le reazioni di dissociazione dei complessi PL sono progressivamente più lente con l'incremento della stabilità del complesso. Tuttavia, i complessi PL con ΔG° di associazione tra -3 e -14 kcal/mole si dissociano velocemente se confrontati con la velocità delle reazioni covalenti. Complessi PL con ΔG° di associazione uguale o inferiore (perché negativo) a -23° kcal/mole si dissociano con velocità comparabili a quelle delle reazioni covalenti.

Affinità e specificità tra proteina ed il legante.

La misura dell'affinità tra la proteina ed il legante è data dal valore della costante di equilibrio, detta anche costante di affinità (K_a) della reazione di formazione del complesso proteina-legante. Più grande è questo valore e maggiore è l'affinità tra proteina e legante. Il valore della K_a è in relazione al numero dei legami deboli che stabilizzano il complesso, e questi legami si possono formare solo se le superfici di contatto, rispettivamente del sito di legame e del legante, combaciano perfettamente. Maggiore è la complementarità di carica e di forma tra sito di legame e legante, e maggiore è il numero dei legami deboli, e quindi maggiore è la specificità della proteina verso il legante. In senso generale, per i complessi proteina-legante, affinità e specificità appaiono direttamente correlate perché ambedue dipendenti dalla precisione con cui combaciano le superfici di contatto del sito di legame con il legante. Maggiore è la precisione e maggiore è la specificità di associazione, perché è più improbabile che il sito di legame possa accogliere un legante con struttura diversa da quella del legante naturale. Ci si può domandare se il valore dell'energia libera di formazione del complesso proteina-legante, oltre ad essere la misura dell'affinità, possa anche esserlo della specificità.

Se consideriamo una proteina che può formare complessi con più leganti (normali componenti cellulari) aventi molecole anche molto simili (isomeri ed analoghi), è proprio la misura della K_a e quindi del ΔG° di associazione con i vari leganti che permette di individuare il legante verso il quale la proteina ha la maggiore affinità e quindi

specificità. Cioè il legante verso il quale la proteina forma il complesso con il minore valore (perchè negativo) di

ΔG° è quello "preferito" e quindi il legante verso il quale la proteina è considerata "specificità". Va tenuto presente che il legante meno affine alla proteina, se non è un composto di escrezione, ha alta affinità per un'altra proteina cellulare, per cui tenderà a formare complessi con questo piuttosto che con la prima.

Considerando i ΔG° di associazione di proteine diverse con i rispettivi leganti, non è possibile stabilire in senso assoluto il grado di specificità che le varie proteine hanno verso i propri leganti. Questo perchè mentre l'affinità dipende dalla quantità totale di energia libera rilasciata nella formazione dei legami che stabilizzano il complesso PL, la specificità dipende dalla estensione totale risultante dalla somma delle superfici complementari esistenti tra proteina e legante (cioè dal numero di legami deboli che si formano) piuttosto che dall'energia di questi stessi legami.

Poichè uno stesso valore di ΔG° di associazione può essere realizzato con un numero diverso di legami deboli, proteine diverse possono avere verso i rispettivi leganti, lo stesso valore di affinità (ΔG° di associazione) e gradi diversi di specificità. Egualmente proteine diverse possono avere verso i propri leganti, valori diversi di ΔG° di associazione con alti valori di specificità (associazione di un singolo legante).

In prima approssimazione un alto valore di affinità ($k_a > 10^6$, $\Delta G^\circ < -8$ kcal/mole), è anche indice di un'alta specificità verso un'unica molecola o verso due o tre molecole molto simili. Invece un valore relativamente basso di affinità (ad esempio:

$K_a = 5 \cdot 10^2$, $\Delta G^\circ = -3,8$ Kcal/mole) può essere associato anche ad alti gradi di specificità che permettono alla proteina di discriminare enantiomeri ed analoghi.

Quindi appare importante chiarire cosa possa essere responsabile degli alti valori di specificità quando apparentemente questi non hanno un contro-valore di energia libera.

Alcuni Autori hanno proposto che nella formazione dei complessi proteina-legante, differenti tipi di legame siano responsabili dell'affinità, cioè della stabilità del complesso e della specificità dell'interazione tra proteina e legante. Le interazioni idrofobiche e le forze di Van der Waals sarebbero principalmente responsabili dell'associazione tra proteina e legante, mentre i legami ad H sarebbero responsabili della specificità di associazione senza o con molto scarsa contributo alla stabilità del complesso PL. Ciò era spiegato assumendo che il legante, nello spezzare i legami a H che i suoi gruppi polari e/o carichi facevano in soluzione con l'acqua (desolvatazione), assumesse circa la stessa quantità di energia libera che poi avrebbe liberato nel formare i legami ad H e/o salini con la proteina. Per cui, la formazione di legami a H tra L e P non contribuiva al valore complessivo del ΔG° di associazione. Recentemente, mediante mutagenesi sperimentale di proteine delle quali si conosceva la struttura tridimensionale del sito di legame associato al legante, si è potuto valutare il

ΔG° di formazione di singoli legami a H ed a H-salini (vedere fig. 2-6 e paragrafi precedenti). Questi esperimenti hanno chiaramente dimostrato che i legami a H possono dare un significativo contributo alla stabilità del complesso. L'ipotesi iniziale è stata mantenuta e modificata nel senso che per essa è ancora valido il presupposto che il maggior contributo alla stabilità sia dato dalle interazioni idrofobiche e dalle forze di Van der Waals, mentre i legami ad H contribuiscono prevalentemente alla specificità. Inoltre, l'energia libera rilasciata nella formazione dei legami ad H sarebbe la misura specifica della specificità di associazione tra P ed L e non il ΔG° di associazione, cioè l'energia libera rilasciata da tutti i tipi di legame debole (a H, salino, idrofobico e di Van der Waals) che contribuiscono alla stabilità del complesso PL. Così modificata, l'ipotesi ammette l'esistenza di una relazione tra specificità ed energia libera che contribuisce anche alla stabilità del complesso specialmente quando il legante è ricco di gruppi polari o carichi. Il legante si associa al sito di legame della proteina per effetto idrofobico con un corretto inserimento nel sito ma non necessariamente ottimale. La precisione di associazione ed il mantenimento di questa precisione sono definiti dai legami ad H che con la loro formazione bloccano i micromovimenti tra P ed L permessi dalle interazioni idrofobiche e di Van der Waals. I due eventi : associazione idrofobica e formazione dei legami ad H avverrebbero uno dopo l'altro molto ravvicinati nel tempo o istantaneamente. Se per ipotesi ammettiamo che il sito di legame di una proteina sia completamente idrofobico ed abbia la forma di un basso cilindro aperto sulla superficie della proteina, ogni molecola idrofobica costituente una figura geometrica iscrivibile nel cerchio base del cilindro è un legante della proteina e questo legante può assumere più posizioni sempre aderendo al cerchio base. Se sul cerchio si trovano delle cariche (unitarie o parziali), il numero dei leganti sarà ridotto a quelle molecole con figura geometrica iscrivibile nel cerchio ed aventi cariche e disposizione geometrica delle stesse tali da formare legami a H o salini con le cariche del sito di legame. È importante che tutte le cariche del legante e del sito di legame siano impegnate in legami tra loro altrimenti la carica libera può interagire con l'acqua e l'ingombro dell'acqua essere impedimento alla formazione del complesso. Se la superficie, base del cilindro, invece di essere piana è irregolare oltre che possedere cariche, il numero dei possibili leganti può essere ridotto a poche specie molecolari od una sola. Risulta così che il sito di legame ha un alto grado di specificità in relazione alla geometria della sua superficie ed al numero delle sue cariche. Ciò è in relazione al fatto che in natura le molecole di leganti anche molto simili tra loro (analoghi ed isomeri) differiscono per una o più cariche (unitarie o parziali) o per una diversa superficie (forma tridimensionale) di interazione con il sito. Bisogna assumere che nella formazione del complesso proteina-legante esistano almeno due tipi di specificità: 1) la specificità idrofobica alla quale contribuiscono le interazioni idrofobiche e le forze di Van der Waals che è

determinata dalle restrizioni steriche che la realizzazione di questi legami impongono ai possibili leganti. Il numero e la irregolarità delle superfici idrofobiche di interazione tra legante e sito di legame portano ad aumentare il grado di specificità idrofobica.

2) la specificità idrofila che dipende dal numero e dalla forza dei legami a H e salini che si formano tra legante e sito di legame. La formazione dei legami a H e salini perfeziona e stabilizza l'assetto del legante nel sito di legame. I residui aminoacidici polari o carichi che interagiscono con il legante possono contribuire alla specificità di legame anche impedendo stericamente l'inserimento nel sito di legame di leganti che non possono interagire con essi. Cioè esiste anche per interazioni polari un effetto di superficie.

Un legante, analogo del legante naturale della proteina, che abbia sostituito un -OH con un -H (perdita di carica e riduzione di volume) si può inserire egualmente nel sito di legame ma non formando il legame a H ha rispetto al legante naturale, una K di affinità inferiore di 8 e 1000 volte se il legame a H perso ha rispettivamente una forza di 1 e 4 kcal/mole (vedere fig.2-6). La Natura può costruire un sito di legame in modo che la mancata formazione di un singolo legame a H tra sito di legame e legante non naturale sia sufficiente a causare una forte riduzione di affinità da rendere il legante scarsamente associabile alla proteina. L'energia di quel legame viene indicata come responsabile della specificità di associazione anche se poi l'energia libera rilasciata contribuisce a rafforzare il complesso PL. Analogo ragionamento si può fare per un legante che abbia un gruppo -CH₂- e tramite esso formi una interazione idrofobica (circa -2 kcal/mole) in una corrispondente nicchia del sito di legame di una proteina. La sostituzione di un -H con un -OH riduce l'interazione idrofobica a -1kcal/mole e la presenza dell'ossidrile (maggior volume di quello di un -H, anche se non è idratato) può ostacolare la formazione del complesso fino ad impedirla. In questi casi, una singola sostituzione (-OH con -H) può causare una riduzione di K_a superiore a quella che ci si aspetterebbe per la mancata formazione di una interazione idrofobica (-2 kcal/mole), perchè per impedimento sterico il legante non si inserisce correttamente nel sito di legame e quindi, anche con la parte della sua molecola non modificata, non riesce a formare gli altri legami che formava in precedenza con il sito di legame.

Molte interazioni idrofobiche tra molecole biologiche avvengono tra gruppi costituiti da C legati covalentemente con H. Poiché l'H è l'atomo più piccolo ed ha elettronegatività circa uguale a quella del C, qualsiasi sostituzione di H con altri atomi o gruppi atomici finisce con il dotare l'atomo di C di un sostituito idrofilo e/o di maggior ingombro sterico. Anche la deidrogenazione a carico di atomi di C (-CH₂-CH₂- → -CH₂-CH₂-) pur non aumentando il volume di quella parte di molecola, ma causa un'alterazione nella geometria della molecola sicuramente percepibile dal sito di legame di una proteina. Nella specificità idrofobica, la riduzione della affinità tra P ed L dipende dalla mancata formazione dell'interazione e da

impedimenti sterici. Gli impedimenti sterici possono mancare nella specificità idrofila, quando un gruppo idrofilo (ad es. -OH) è sostituito con un -H. Il legame a H non si forma, ma avendo dimensioni più piccole dell' -OH non causa impedimenti all'associazione del legante al sito di legame.

Casi particolari di affinità-specificità

1. E' stato osservato che una proteina enzimatica che associa il legante-substrato (glucosio) con alto grado di specificità (non associa enantiomeri del glucosio) ma con scarsa affinità ($K_a = 5 \cdot 10^2$, $\Delta G^\circ = -3,83$ kcal/mole) pur formando con il legante 9 legami a H. Alcuni dei legami a H sono più deboli della media (1 kcal/mole) e ciò è realizzato da un sito di legame che non permette che gli atomi del sito e del legante si pongano a distanza e/o con l'angolazione giusta per formare legami a H più forti. Tuttavia la disposizione dei residui aminoacidici responsabili dei legami a H è sufficientemente precisa da non permettere l'associazione stabile di analoghi del glucosio legante-substrato come mannosio, galattosio, 6-deossi-glucosio, acido glucuronico, fucosio. La K_a calcolata per questi composti è più di 50 volte inferiore alla K_a del glucosio. Questo valore può essere anche molto basso, ma il metodo usato per valutarlo non permetteva di rilevare valori inferiori alle 50 volte. In questo modo la Natura ha assolto il difficile compito di costruire una proteina con bassa affinità per il glucosio (la bassa affinità per il substrato è richiesta dagli enzimi per operare la catalisi sul complesso ES) ed un'alta specificità per evitare l'associazione di composti naturali (analoghi ed enantiomeri del glucosio) presenti nelle cellule insieme al glucosio. L'alta specificità e quindi il riconoscimento degli analoghi del glucosio è realizzato mediante la mancata formazione di legami a H (es. nel 6-deossi-glucosio, l'-OH in posizione 6 è sostituito con -H) e/o per impedimento sterico (es. nel mannosio e galattosio dove la posizione del-OH è invertita rispetto a quella del -OH del glucosio). In questo ultimo esempio si ha anche la perdita di un lega a H.

2. Un altro caso particolare di affinità-specificità tra proteina e legante si ha quando la proteina è allosterica ed è indotta a cambiare conformazione dopo che ha legato il legante, e questo cambiamento è contrastato da effettori o da altre subunità (vedere capp. 3 e 6). Quindi la proteina, pur riconoscendo un unico legante, lo può associare con affinità diverse in relazione alla presenza o meno di effettori o di subunità. La ridotta affinità e quindi il minor valore assoluto di energia libera di associazione, dipende dal fatto che il legante, per potersi associare alla proteina, deve avere energia sufficiente a spezzare i legami tra proteina ed effettore e/o tra proteina e subunità, oppure la molecola proteica deve essere in condizioni energetiche più alte della media ed avere i suddetti legami già spezzati prima di associare il legante.

3. Nelle proteine regolate il ΔG° di associazione, e quindi l'affinità, è regolabile, mentre la specificità rimane invariata. Il valore del ΔG° di associazione non appare correlato con il grado di specificità. La spiegazione di

questa discordanza sta nel fatto che quando la proteina regolata passa da uno stato di alta affinità a bassa affinità, quindi a parità di concentrazione di P ed L si ha una riduzione di complessi formati, non si ha una variazione nel numero dei legami deboli tra P ed L, ma una variazione nel numero di molecole di P capaci (affini) di legare L. Quindi sia che si formino pochi o molti complessi, essi saranno formati in ogni singolo complesso dallo stesso numero di legami deboli (stessa specificità), mentre varia il numero totale dei complessi.

La specificità verso il legante è definibile assoluta o relativa. E' assoluta quando la proteina può legare solo una specie molecolare di legante (normale costituente cellulare), è relativa quando la proteina può legare più leganti (normali costituenti cellulari) che hanno in genere strutture molecolari molto simili. Anche se dotata di specificità assoluta, la proteina può commettere errori di riconoscimento (vedere dopo), il termine "assoluta" si riferisce alla capacità di riconoscere un solo legante. La specificità relativa non deve essere considerata un difetto perchè sintetizzare un'unica proteina capace di legare tre metaboliti, può essere energeticamente più conveniente che avere tre proteine con specificità assoluta. Ad esempio, l'albumina è capace di trasportare acidi grassi con catene alifatiche di diversa lunghezza, e questa specificità relativa risponde alle esigenze di trasporto di molecole diverse che sono rilasciate contemporaneamente nel sangue a livello del tessuto adiposo ed utilizzate nei vari tessuti a fini energetici, indipendentemente dalla lunghezza della loro catena. Avere una sola specie molecolare (albumina), dotata di specificità relativa, è energeticamente più conveniente che sintetizzare più molecole proteiche dotate di specificità assoluta. La specificità assoluta o relativa è in genere riferita a composti normali costituenti cellulari. Infatti, la Natura seleziona le proteine anche in relazione alla loro capacità di riconoscere composti normali costituenti cellulari. Si possono sintetizzare composti capaci di associarsi al sito di legame di proteine dotate di specificità relativa o anche assoluta per i loro leganti naturali. Molti farmaci sono sintetizzati con questa finalità.

Sommario :

1. Nella formazione dei complessi PL, l'affinità (stabilità del complesso) e la specificità (riconoscimento del legante) sono determinate dai legami deboli che si formano tra P ed L.
2. L'affinità è in relazione inversa al ΔG° di associazione. Il ΔG° di associazione è la somma dei ΔG° dei singoli legami deboli che si formano tra P ed L.
3. La specificità è in relazione diretta al numero di legami deboli che si formano tra P ed L. La formazione dei legami deboli è il mezzo tramite il quale la proteina opera il riconoscimento del legante. Maggiore è il numero delle interazioni tra P ed L e maggiore è la specificità di

legame. A parità di numero di legami deboli esistenti tra P ed L, la specificità è maggiore quando la forza dei legami è maggiore. Perchè in genere, una maggiore forza di legame è in relazione ad una maggiore precisione delle superfici di interazione tra P ed L.

Possibilità di errori da parte della proteina nel riconoscimento del proprio legante.

Molti complessi proteina-legante non sono molto troppo stabili al fine di essere facilmente dissociabili nelle condizioni cellulari. Da ciò risulta che, sebbene la specificità di una proteina sia in genere molto alta, non può essere del tutto esente da errori perchè, a causa degli urti tra molecole provocati dal calore, gli atomi delle molecole biologiche possono avere valori energetici diversi rispetto ai valori medi, che causano distribuzioni di elettroni non tipiche di tali atomi. Queste distribuzioni atipiche in genere hanno vita breve ma talvolta possono averla sufficientemente lunga da permettere l'associazione alla proteina di leganti diversi dal normale legante e su questi operare l'attività biologica: trasporto, catalisi, attivazione di recettori ecc.

Da ciò risulta che nella cellula accadono continui errori di riconoscimento molecolare, ma la cellula è attrezzata per annullarli con un continuo turnover di tutti i componenti cellulari. Le molecole senza turnover (il DNA di tutte le cellule e le proteine degli eritrociti) o con turnover lento, vengono riparate con specifiche reazioni (vedere cap.7, appendice 2).

La possibilità di errore si annullerebbe se tra proteina e legante liberi ed associati, ci fosse una differenza infinita di energia libera. Se il ΔG° di formazione dei complessi fosse inferiore (complesso più stabile) di quello che la Natura ha selezionato, la possibilità di errore sarebbe inferiore, ma ciò porterebbe ad avere una reversibilità più lenta. Molti cambiamenti di conformazione della proteina sarebbero più lenti con alterazione di processi di regolazione e di attività biologica. Per la vita dei sistemi biologici è richiesta una certa temperatura affinché le molecole possano diffondere e quindi interagire tra loro e sono richieste opportune concentrazioni di reagenti (macromolecole e piccole molecole) affinché si possano incontrare con frequenze sufficientemente alte e formare complessi più o meno stabili. L'esigenza di una certa temperatura e quindi di uno stato disordinato delle molecole in soluzione, comporta anche che gli atomi delle molecole vibrino, oscillino e ruotino ed abbiano stati energetici diversi. Ciò favorisce la dissociazione dei complessi proteina-legante e quindi la veloce reversibilità della formazione dei complessi PL, permettendo così l'esistenza dei meccanismi molecolari di regolazione.

Tuttavia ciò comporta una costante, anche se relativamente bassa, frequenza di errori nei riconoscimenti molecolari. La scelta evolutiva della Natura è stata quella di eliminare gli errori con turnover e la riparazione delle molecole, piuttosto che avere complessi con ΔG° di formazione fortemente negativi più difficilmente reversibili e più restii a cambiare conformazione. Questa scelta può essere stata anche influenzata dal fatto che le macromolecole e le strutture sopramolecolari delle cellule possono essere alterate, oltre che dagli errori di sintesi, anche da reazioni non catalizzate con composti inquinanti la cellula o da radiazioni, per cui i meccanismi di turnover e di

riparo sarebbero stati comunque necessari per mantenere l'integrità cellulare anche in condizioni in cui la frequenza di errore nel riconoscimento molecolare fosse stato uguale a zero.

Gli errori di sintesi di DNA che risultano in sostituzioni di coppia di basi (mutazioni) non sono riconosciute dai sistemi di riparazione del DNA e sono responsabili di una lenta e continua alterazione del DNA di un individuo (mutazioni somatiche) e di una specie quando la mutazione interessa le cellule germinali.

Alcune considerazioni sulle soluzioni dei sistemi biologici.

La soluzione acquosa nei sistemi biologici, cioè nelle cellule e nei fluidi biologici, è dinamica a causa del calore che provoca la diffusione delle molecole in tutte le direzioni dello spazio. Ciò causa che le molecole si urtino continuamente tra loro e che i loro atomi vibrino continuamente e che si spezzino i legami secondari (deboli) che legano tra loro le molecole. Ciò evita che alle temperature dei sistemi biologici il protoplasma gelifichi, come avviene quando si abbassa la temperatura e si riduce così il movimento delle molecole. Nonostante questo continuo urtarsi di ioni monoatomici, molecole e macromolecole, si formano con velocità alte dei complessi proteina-legante e proteina-macromolecola, che hanno stabilità tali da resistere all'azione distruttiva del calore quando possono formare un certo numero di legami deboli tra loro. Se i legami sono relativamente pochi (vedere tab. 2-2), il complesso viene continuamente dissociato per riformarsi di nuovo, e comunque una certa concentrazione di complesso è sempre presente (es. enzimi-substrato, proteine di trasporto-metabolita trasportato, ecc.). Se i legami tra P ed L sono molti, si formano complessi stabili che non si dissociano per tempi molto lunghi (es. subunità di oligomeri, complessi di enzimi, citoscheletro ecc.). Nelle soluzioni biologiche questo stato stazionario di complessi viene continuamente alterato in tre modi.

- 1) dall'introduzione (o espulsione) di molecole nelle (o dalle) cellule o dagli organelli subcellulari, cioè con diffusione di molecole attraverso membrane.
- 2) per cambiamenti conformazionali della proteina che cambia affinità verso il legante (allosterismo, cap. 3)
- 3) per la trasformazione di molecole in altre per mezzo di reazioni covalenti catalizzate (metabolismo).

Alle temperature dei sistemi biologici i legami covalenti sono spezzati molto raramente, le reazioni covalenti sono catalizzate da enzimi specifici che elevano la velocità di reazione di circa 10^8 volte.

Una molecola polare che entra nei fluidi biologici o nelle cellule si muoverà casualmente mossa dall'azione del calore, se polare o carica formerà con l'acqua legami a idrogeno di breve durata, così continuerà a diffondere finché non incontrerà una proteina specifica con la quale potrà formare un complesso sufficientemente stabile. Se la proteina associata è una proteina di trasporto, la molecola legante rimarrà associata alla proteina per tempi più o meno lunghi

in relazione al valore del ΔG° di formazione del complesso, ed il numero dei complessi presenti nell'unità di tempo rimarrà costante fino a quando il legante e/o la proteina non varieranno in concentrazione. Se il legante si associa ad una proteina enzimatica verrà coinvolto in una reazione covalente. Il numero di trasformazioni per molecola di enzima (numero di turnover) è per molti enzimi intorno a 1000/sec (vedere cap. 4), così una molecola rimarrà legata ad un enzima per tempi molto brevi, il prodotto di reazione troverà nella cellula altri enzimi che lo legano e così via, fino ad arrivare ai prodotti di escrezione. In genere, ogni metabolita ha nella cellula e nei liquidi biologici una o più proteine che lo legano specificamente. Un metabolita intermedio si lega ad almeno un enzima per venire trasformato in un altro composto. Anche l'acqua, essendo reagente di molte reazioni covalenti, si lega specificamente agli enzimi che catalizzano queste reazioni. In conclusione: nelle soluzioni biologiche le reazioni avvengono velocemente perchè o interessano la rottura e formazione di legami deboli (associazione proteina-legante, associazione proteina-macromolecola), o perchè, sebbene interessi la rottura e formazione di legami covalenti, sono tutte catalizzate da enzimi specifici. L'associazione substrato-enzima è veloce perchè avviene mediante legami deboli, la catalisi, sebbene sia la fase più lenta, ha frequenza altissima, in genere di migliaia di volte al secondo.

Si può dire che tutte le reazioni che avvengono nei sistemi biologici (di associazione e covalenti) hanno la prima fase dotata di alta velocità, specificità ed affinità, perchè avviene via la formazione di legami deboli tra proteina e legante. Questa prima fase, detta "riconoscimento molecolare", che è l'unica per alcuni tipi di proteina (proteine deposito e proteine trasportatrici) può avere una seconda fase: catalisi negli enzimi, trasduzione del segnale dell'ormone e del fattore di crescita nei rispettivi recettori ecc.).

Sommario.

1. Con le concentrazioni di P ed L presenti nelle cellule e nelle soluzioni biologiche, i complessi PL si formano con velocità molto alte, solo $10 \div 100$ volte inferiori alla velocità di associazione controllata dalla diffusione: $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.
2. La velocità di dissociazione del complesso PL è molto inferiore a quella della sua formazione (tra 200 e 10 milioni di volte).
3. I complessi PL dissociabili nelle condizioni cellulari hanno valori di ΔG° di associazione compresi tra -3 e -14 kcal/mole.
4. Il ΔG° di attivazione per la formazione del complesso ha un valore molto piccolo (circa 2kcal/mole).
5. Il ΔG° di attivazione per la dissociazione del complesso ha il valore del ΔG° di associazione, cambiato di segno, ed addizionato di circa 2kcal/mole (vedere punto 4).
6. L'energia libera di attivazione per la dissociazione del complesso sebbene possa avere valori molto alti relativamente all'energia di attivazione per l'associazione del complesso,

è fornita dall'energia cinetica delle molecole a 37°C.

7. L'affinità e la specificità della reazione di associazione tra P ed L dipende dalla complementarità di forma e di carica delle superfici di interazione esistenti tra sito di legame e legante. L'affinità dipende dall'energia libera rilasciata dai legami deboli che si formano tra P ed L. La specificità dipende dal numero di legami deboli che si formano tra P ed L piuttosto che dalla loro forza.

8. Nelle condizioni cellulari di concentrazione e temperatura, le reazioni covalenti procedono con velocità non utilizzabili per funzioni biologiche. La velocità delle reazioni covalenti può essere fino a 10^{20} inferiore a quella delle reazioni di associazione.

9. La barriera di energia libera di attivazione che si oppone al procedere delle reazioni covalenti (sia esergoniche che endoergoniche) svolge l'importante funzione di mantenere stabili le molecole e le macromolecole sintetizzate nelle cellule. In assenza di tale barriera, le molecole e le macromolecole, potendo partecipare a molte reazioni esergoniche con altre molecole presenti nelle cellule stesse, sarebbero rapidamente degradate e la vita, così come la conosciamo, non potrebbe esistere.

Tab. 2-1

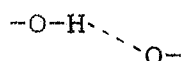
Legami delle molecole, delle macromolecole e tra molecole delle soluzioni biologiche.

Un legame chimico ha un valore costante di energia libera a T costante, mentre l'energia libera di uno stesso tipo di legame può essere molto diversa in relazione agli atomi ad esso vicini appartenenti alla stessa molecola. Ciò è vero anche per i legami deboli che si instaurano tra proteina e legante. In tabella sono indicati i valori estremi dell'energia libera dei legami; la media di questi due valori non rappresenta il valore di energia libera più frequentemente riscontrato.

Il legame covalente si forma fra due atomi quando ciascun atomo mette in comune con l'altro un proprio elettrone, ed in questo modo i due atomi completano il loro orbitale più esterno.

Se gli atomi in legame hanno valori diversi di elettronegatività, il legame covalente può avere una percentuale più o meno grande di carattere ionico, a causa dello spiazzamento più o meno grande della nube elettronica su l'uno o l'altro atomo. I legami covalenti fra gli atomi costituenti le molecole e macromolecole biologiche (H, O, C, N, P, S) sono detti "forti" perchè nelle soluzioni acquose non vengono spezzati dall'energia termica che, a 37°C, è circa 0,9 kcal/mole. La forza del legame covalente e la distanza tra gli atomi in legame (che è una misura della forza del legame) sono in relazione inversa: esse variano in relazione agli atomi coinvolti ed al mezzo in cui si trovano le molecole; tuttavia nelle molecole biologiche anche il meno forte dei legami covalenti per essere spezzato, chiede una energia 50 volte superiore all'energia termica. Quindi le reazioni covalenti che interessano le molecole biologiche, hanno energia di attivazione molto alta, e si assume che nelle cellule non avvengano reazioni covalenti se non catalizzate da enzimi. I sette atomi costituenti le molecole biologiche sono uniti tra loro da legami covalenti, questi stessi atomi possono interagire ulteriormente e formare legami a H, salini, idrofobici e forze di Van der Waals. Questi legami sono indicati come legami "deboli" o interazioni secondarie, perchè nelle soluzioni acquose sono frequentemente spezzati dall'agitazione termica delle molecole. Il più forte di questi legami è solo 8 volte più forte dell'energia cinetica media delle molecole.

Il legame a idrogeno nelle molecole biologiche ha una lunghezza che è circa il doppio di quella che l'atomo di idrogeno avrebbe se fosse legato covalentemente con lo stesso atomo. La forza del legame a idrogeno e così la sua lunghezza, dipende dagli atomi coinvolti, dal mezzo in cui si trovano gli atomi ed anche dal fatto che i tre atomi che formano il legame si trovino sulla stessa retta o formino un angolo:



Nel primo caso, a parità di condizioni, il legame H è più forte. Per questa caratteristica il legame a H è detto direzionale. L'energia libera di un legame a H tra gruppi non carichi varia tra 0,5-1,8 kcal/mole. Se uno dei due gruppi in legame è carico l'energia libera di legame è intorno a 4 kcal/mole.

Il legame salino (anche detto ionico), che è forte nel vuoto, risulta essere debole in soluzione acquosa a causa dell'alta costante dielettrica dell'acqua. Le molecole di sali come NaCl, sono completamente dissociate in acqua e circondate da molecole d'acqua. I cationi inorganici (Na^+ , K^+ , Mg^{2+}) ed anioni inorganici (Cl^- , HPO_4^{2-}) possono interagire con molecole organiche ionizzate, tuttavia l'interazione è debole e quindi instabile se non si formano più interazioni deboli con le molecole organiche.

Quando i gruppi $-\text{COO}^-$ e $-\text{NH}_3^+$ interagiscono tra loro, formano un legame altamente direzionale che ha le caratteristiche di un legame a idrogeno e che risulta in genere più stabile (fino a 7kcal/mole) del legame a H tra gruppi non carichi.

Le forze di Van der Waals sono interazioni che in genere si instaurano tra molecole o tra gruppi atomici non carichi. I gruppi atomici possono appartenere anche a molecole aventi altri gruppi polari o carichi. Queste forze, dette anche forze di dispersione o di London, si generano perchè la distribuzione degli elettroni intorno al nucleo di un atomo, cambia nel tempo e non è mai perfettamente simmetrica, per cui genera un dipolo. Cioè, dove gli elettroni sono più addensati si ha una parziale carica negativa; l'addensamento degli elettroni da una parte crea una parziale carica positiva nell'atomo vicino, il cui nucleo è rimasto parzialmente o momentaneamente scoperto di elettroni. Il dipolo così generato, sebbene transiente, può alterare momentaneamente la distribuzione delle cariche di atomi vicini che sono indotti a formare un altro dipolo disposto in modo che zone con cariche opposte si trovino vicine, determinando una attrazione tra gli atomi di molecole diverse. Più gli atomi sono vicini, maggiore è l'attrazione, fino ad una distanza limite (raggio di Van der Waals), oltre la quale si generano forze repulsive molto forti perchè i gusci elettronici esterni degli atomi iniziano a sovrapporsi.

Le forze di Van der Waals si instaurano tra gruppi atomici costituiti da atomi di idrogeno legati ad atomi di carbonio ed anche tra questi gruppi ed atomi di ossigeno e zolfo. Fino a poco tempo fa si riteneva che l'energia libera delle forze di Van der Waals fosse intorno ad 1kcal/mole, tuttavia in alcuni complessi PL, le forze di Van der Waals tra gruppi $-\text{CH}_2-$ ed $-\text{S}-$ raggiungono valori di -5kcal/mole e superano il valore dell'effetto idrofobico esercitato sugli stessi gruppi.

L'interazione idrofobica è l'interazione tra molecole apolari o gruppi apolari di molecole in soluzione acquosa. Molecole apolari possono associarsi se attratte dalle forze di Van der Waals, ma in soluzione acquosa la forza che unisce le due molecole è superiore perchè le molecole idrofobiche, e così i gruppi idrofobici di una molecola polare, disturbano il cristallo liquido costituito dalle

molecole di acqua che interagiscono tra loro formando legami a H. L'acqua tende a fare il massimo numero di legami a H con se stessa, e si assume che quando le molecole di soluto sono associate, piuttosto che dissociate, l'acqua abbia una maggiore possibilità a fare legame a H. Quindi le molecole ed i gruppi idrofobici, più di quelli idrofili, tendono ad essere esclusi dall'acqua e ciò porta ad incrementare la loro tendenza a stare uniti oltre a quella fornita dalla attrazione data dalle forze di Van der Waals.

L'interazione idrofobica non è un vero legame perchè non è determinato da una attrazione tra molecole che si associano, ma dall'acqua in cui le molecole sono immerse, che tende ad escludere da essa le molecole ed i gruppi apolari e ne determina l'associazione tra loro. Se le parti che interagiscono tra loro sono complementari, cioè combaciano perfettamente, l'interazione che si instaura può essere molto forte perchè la parte idrofobica viene completamente esclusa dall'acqua. La forza del legame idrofobico tra due residui aminoacidici varia tra 0,7kcal/mole dell'alanina e circa 3kcal/mole della fenilalanina. Questi valori sono stati calcolati assumendo il valore zero per l'interazione di due residui di glicina. E' importante ricordare che spesso si usa il termine di interazione o legame idrofobico per indicare l'interazione tra gruppi atomici idrofobici che stanno uniti in virtù del legame idrofobico e delle forze di Van der Waals. Questo perchè spesso è difficile stabilire il contributo dei due tipi di interazione.

Il legame di coordinazione si forma tra un metallo che ha uno stato di ossidazione 2 o 3 e lega, in relazione alla sua natura chimica, 4 o 6 leganti con disposizione geometrica simmetrica. Legami di coordinazione si possono formare tra uno ione metallico ed i residui aminoacidici di una proteina.

Nei sistemi biologici esistono molti complessi a simmetria ottoedrica tra uno ione metallico (Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Zn^{2+}) ed una porfirina (o una molecola molto simile a questa) che è un chelante tetradentato, e costituisce il gruppo prostetico di una proteina. In alcune proteine il metallo forma 4 legami di coordinazione con la porfirina e gli altri due legami, posti perpendicolarmente a questi, sono formati con due residui amino acidici della proteina stessa. La proteina lega con altri residui anche la porfirina.

Nella emoglobina e mioglobina, la globina lega la protoporfirina IX che, a sua volta, chela con 4 legami di coordinazione un atomo di Fe^{2+} . La globina con un residuo di istidina, forma il quinto legame di coordinazione con il ferro. Il sesto legame di coordinazione è formato con una molecola di O_2 (fig. 6-15, 6-18).

I legami di coordinazione che il ferro ha con la protoporfirina IX ed istidina sono molto stabili, mentre quello con l' O_2 è reversibile nelle condizioni delle soluzioni cellulari, ed ha tutte le caratteristiche di un legame debole. Infatti l'associazione tra O_2 ed il ferro della Hb e Mb è velocemente reversibile per piccole variazioni di pO_2 (fig. 6-4). In tabella è indicata la lunghezza approssimativa del legame di coordinazione tra Fe^{2+} ed un atomo di azoto della porfirina. Nei complessi di coordinazione, le molecole che legano il metallo sono dette

leganti. Nelle Hb e Mb, i leganti del ferro sono la porfirina, il residuo di istidina della globina e, quando presente, anche l'O₂.

In biochimica il termine legante non è ristretto ai soli complessi di coordinazione, ma anche più genericamente ad ogni molecola che si associ ad una proteina, sia che la proteina abbia o no un metallo nel sito di legame.

In tabella, la distanza tra gli atomi in legame è indicata nei suoi valori estremi. Al fine di avere una comparazione, sono riportate le distanze tra O ed H nei vari tipi di legame (covalente, a idrogeno e forze di Van der Waals). Il legame a H è maggiore del corrispondente legame covalente e minore di quello con forze di Van der Waals. Inoltre, se l'atomo di O che interagisce con l'atomo di H è ionizzato, la lunghezza del legame a H può raggiungere lunghezze minori rispetto a quando l'atomo di O non è carico. Si può arrivare ad un legame a H più breve anche quando l'atomo di H è legato ad uno di N carico positivamente rispetto ad un N non carico.. Nel legame salino con caratteristiche di legame a H, cioè quando il legame a H si forma tra un atomo di O con una carica negativa ed un atomo di H legato ad uno di N con carica netta positiva, il legame a H può raggiungere lunghezze inferiori a quelle dei legami a H indicati in tabella.

Concludendo: nelle cellule c'è una specializzazione nella funzione dei legami, il legame covalente è il legame delle molecole: piccole molecole (metaboliti) e della struttura primaria delle macromolecole. I legami deboli sono responsabili della struttura tridimensionale delle macromolecole, delle associazioni tra macromolecole e tra macromolecole e piccole molecole. Il legame di coordinazione multiplo ha la funzione di chelare ioni metallici, quello singolo di legare reversibilmente piccole molecole.

Tab. 2-1

		CARATTERISTICHE DEI LEGAMI				
TIPO DI LEGAME		n° del legami di uno stesso elemento	rotazione	angolo	Lunghezza Å	forza Kcal/mole
F O R T E	covalente	n° fisso (covalenza) H=1; O=2 N=3; C=4 P=5; S=6 S=2	Libera nel singolo Impedita nel doppio e triplo	fisso	È la minore tra tutti i tipi di legame 0,96 ++ -O-H	50÷150 singolo 140÷160 triplo 190÷220 doppio
	a idrogeno	H= solo 1 O=1 O=2 (raramente)	Libera	variabile direzio- nale	$\begin{array}{l} \text{+---+} \\ \text{-O-H...O} \quad 1,74 \\ \text{-O-H...O} \quad 1,67 \\ \text{-N-H...O} \quad 2,04 \\ \text{-N}^+\text{-H...O} \quad 1,93 \end{array}$	0,5÷5
	salino o ionico	n° fisso valenza ionica = n° di elettroni assunti o persi	Libera	variabile direzio- nale	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{-C-O}^-\text{...H-N}^+\text{-} \\ \\ \text{H} \end{array}$	0,7÷7
	idrofobico	non definito Limitato solo dall'ingombro sterico.	Libera	variabile	come in van der waals	0,3÷4
	forze di Van der waals	non definito Limitato solo dall'ingombro sterico	Libera	variabile	$\begin{array}{l} \text{+---+} \\ \text{-O...H-} \quad 2,5 \\ \text{-N...H-} \quad 2,6 \end{array}$	0,3-5
I	di coordina- zione	n° fisso n° 6 (più comune)	Libera per singolo legame	fisso	$\begin{array}{c} \text{+---+} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{---Fe---N} \\ \diagdown \quad \diagup \end{array} \quad 2,2$	6÷8

Tab. 2-2

Relazione tra il rapporto del numero delle molecole, con concentrazioni molari dei complessi proteina-legante (PL) e proteine libera (P) in condizioni di equilibrio, con la costante di affinità (K_a), con la variazione dell'energia libera di associazione (ΔG°) e con il numero dei legami deboli che stabilizzano il complesso PL.

1-I valori sono quelli dell'equilibrio raggiunto partendo dalle condizioni standard ($[P]=[L]=[PL]=1\text{ M}$).

2-Si è assunto che il valore medio dell'energia libera di un legame debole sia 1 kcal/mole a 37°C.

3. Nelle condizioni cellulari i complessi PL possono essere: IN = inesistenti (la velocità della loro dissociazione è molto alta ed uguale a quella di formazione del complesso); NS = non sufficientemente stabili per svolgere funzioni biologiche; stabili e reversibili; NR = non reversibili.

La tabella mostra che:

a) è sufficiente una K_a piccola ($K_a=10^2$) per avere una $[PL]$ alta rispetto alla $[P]$; mentre per avere un alto rapporto di numero di molecole di PL rispetto alle molecole di L libere occorrono $K_a \geq 10^6\text{ M}^{-1}$. Un alto valore di K_a è necessario per formare complessi quando pochissime molecole di P ($1/10.000$) sono presenti nella cellula (vedere testo).

b) sono sufficienti pochi legami deboli per dare stabilità al complesso e la possibilità di formare un singolo legame in più fa aumentare la K_a di circa 10 volte.

Tab. 2-2

n° complessi PL 1 molecola P libera	$\frac{M[PL]}{M[P]}$	K_a M^{-1}	ΔG° $\frac{Kcal}{mole}$ $\Delta 37^\circ C$	n° legami deboli	
$\frac{1}{1}$	$\frac{1M}{1M}$	1	0	0	IN
$\frac{4}{1}$	$\frac{1.6M}{0.4M}$	10	-1,42	1	NS
$\frac{14}{1}$	$\frac{1.853M}{0.136M}$	10^2	-2,84	3	stabili e reversibili
$\frac{44}{1}$	$\frac{1.956M}{44.2 \cdot 10^{-3}M}$	10^3	-4,26	4	
$\frac{141}{1}$	$\frac{1.986M}{14.14 \cdot 10^{-3}M}$	10^4	-5,67	6	
$\frac{446}{1}$	$\frac{1.996M}{4.47 \cdot 10^{-3}M}$	10^5	-7,09	7	
$\frac{1418}{1}$	$\frac{1.999M}{1.41 \cdot 10^{-3}M}$	10^6	-8,51	9	
$\frac{4472}{1}$	$\frac{1.999M}{0.447 \cdot 10^{-3}M}$	10^7	-9,93	10	
$\frac{14700}{1}$	$\frac{1.999M}{0.141 \cdot 10^{-3}M}$	10^8	-11,35	11	
$\frac{44700}{1}$	$\frac{1.999M}{44.72 \cdot 10^{-6}M}$	10^9	-12,77	13	
$\frac{141372}{1}$	$\frac{1.999M}{14.14 \cdot 10^{-6}M}$	10^{10}	-14,19	14	
$\frac{141371900}{1}$	$\frac{1.999M}{14.14 \cdot 10^{-9}M}$	10^{16}	-22,70	23	NR

Tab. 2-3

Relazioni tra costante di conformazione (K_c), con le variazioni di energia libera standard di conformazione (ΔG°), con la differenza del numero di legami deboli, con i rapporti del numero delle molecole e delle concentrazioni di due diverse conformazioni (P_1 e P_2), assunte da una stessa proteina in condizioni di equilibrio.

La reazione di conformazione è reversibile: $P_1 \rightleftharpoons P_2$ e sono considerati i casi in cui le due conformazioni hanno la stessa stabilità ($K_c = 1$) e quelli in cui la conformazione P_2 ha stabilità maggiore di P_1 .

1- Numero delle molecole nella conformazione P_2 per ogni molecola nella conformazione P_1 in condizioni di equilibrio.

2- Rapporto delle concentrazioni molari delle due conformazioni in cui i valori delle concentrazioni sono quelli dell'equilibrio raggiunto partendo dalle condizioni standard, cioè con $[P_1]=[P_2]=1M$

3-Rapporto delle concentrazioni μ molari di P_2 e P_1 partendo da concentrazioni $1000 \mu M$, cioè più vicine a quelle cellulari delle concentrazioni molari.

4- K_c è la costante di conformazione, cioè la costante dell'equilibrio esistente tra le due conformazioni.

5-Il ΔG° è calcolato dal valore di K_c .

6-Differenza tra il numero di legami deboli che stabilizzano la conformazione più stabile (P_2) e quelli che stabilizzano la conformazione meno stabile (P_1). La differenza è zero quando le due conformazioni, pur essendo diverse, hanno la stessa stabilità. Si è assunto che la forza di 1 legame debole corrisponda a circa 1 kcal/mole.

Si parla di reazione di conformazione perchè avviene con la formazione di nuovi legami deboli. La molecola proteica è la stessa, ma la sua reattività è diversa nelle due conformazioni.

Sono sufficienti circa 4 kcal/mole (4 legami deboli) per conferire ad una conformazione una stabilità tale da renderla predominante sull'altra: all'equilibrio il rapporto del numero delle molecole è di 1000 ad 1 e la proteina si trova quasi tutta nella conformazione più stabile (vedere colonne 2 e 3).

Tab. 2-3

1 $\frac{n^{\circ} P_2}{n^{\circ} P_1}$	2 $\frac{M[P_2]}{M[P_1]}$	3 $\frac{\mu M[P_2]}{\mu M[P_1]}$	4 K_c	5 $\frac{\Delta G^{\circ}}{\text{kcal}} \frac{\text{mole}}{\text{a } 27^{\circ}\text{C}}$	6 n° legami deboli
$\frac{1}{1}$	$\frac{1 M}{1 M}$	$\frac{1000 \mu M}{1000 \mu M}$	1	0	0
$\frac{10}{1}$	$\frac{1,82 M}{0,18 M}$	$\frac{1820 \mu M}{182 \mu M}$	10	-1,42	1
$\frac{100}{1}$	$\frac{1,98 M}{0,02 M}$	$\frac{1980 \mu M}{20 \mu M}$	100	-2,84	3
$\frac{1000}{1}$	$\frac{1,998 M}{0,002 M}$	$\frac{1998 \mu M}{2 \mu M}$	1000	-4,26	4
$\frac{10'000}{1}$	$\frac{1,9998 M}{0,0002 M}$	$\frac{1999,8 \mu M}{0,2 \mu M}$	10'000	-5,67	6

Tab.2-4

Costanti di velocità di associazione, di velocità di dissociazione, di affinità e ΔG° di associazione tra proteina e legante (da Miller ed altri J. Biol. Chem. 258, 13665, 1983 e da Fersht pubbl.n°20).¹.

1. Proteine poste sulla membrana plasmatica di cellule batteriche. Con altre proteine sono responsabili del trasporto del legante all'interno della cellula.
2. Le proteine di legame sono proteine di membrane che associano per prime il legante.
3. Epatica.
4. Del cuore di maiale.
5. $-(NaG)_2$ =dimero di N-acetil-glucosamina.

Nella mioglobina l'O₂ si lega al ferro (6° legame di coordinazione) del gruppo prostetico (eme).

Tab. 2-4

PROTEINA	LEGANTE	k_1 ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)	k_2 (s^{-1})	$\frac{k_1}{k_2} = K_a (M^{-1})$	ΔG° ($kCal \cdot mole^{-1}$)
<u>Proteine di deposito</u> Mioglobina	piccola molecola O_2	10^7	10	10^6	-8,51
<u>Proteine di trasporto</u> <u>transmembrana</u> ¹					
<u>Proteine di legame</u> ² :					
P-legante-L-Arabinosio	L-Arabinosio	$2,4 \cdot 10^7$	1,5	$1,6 \cdot 10^7$	-10,2
P-legante-D-Galattosio	D-Galattosio	$3,3 \cdot 10^7$	4,6	$7 \cdot 10^6$	-9,7
P-legante-D-Maltosio	D-Maltosio	$2,3 \cdot 10^7$	90	$2,5 \cdot 10^5$	-7,7
P-legante-L-Istidina	L-Istidina	$1 \cdot 10^8$	9,7	$1 \cdot 10^7$	-9,9
P-legante-L-Glutamina	L-Glutamina	$9,8 \cdot 10^7$	16	$6 \cdot 10^6$	-9,6
<u>Enzimi</u>					
Alcohol deidrogenasi ³	NADH	$2,5 \cdot 10^7$	9	$2,8 \cdot 10^6$	-9,1
Creatina cinasi	ADP	$2,2 \cdot 10^7$	$1,8 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^3$	-4,4
Creatina cinasi	Mg-ADP	$5,3 \cdot 10^6$	$5,1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^3$	-4,3
Gliceraldeide deidrogenasi	NAD ⁺	$1,9 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^3$	$1,9 \cdot 10^4$	-6,7
Lattato deidrogenasi ⁴	NAOH	$5,5 \cdot 10^7$	39	$1,4 \cdot 10^6$	-8,7
Lisozima ⁵	(NAG) ₂	$4 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^5$	$4 \cdot 10^2$	-3,7
Malato deidrogenasi	NADH	$5 \cdot 10^8$	50	$1 \cdot 10^7$	-9,9
Piruvato carbossilasi	Piruvato	$4,5 \cdot 10^6$	$2,1 \cdot 10^6$	$2,1 \cdot 10^2$	-3,3
Ribonucleasi	3' UMP	$7,8 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^4$	$7,1 \cdot 10^3$	-5,5
Tirosil-tRNA sintetasi	Fenilalanina	$2,4 \cdot 10^6$	24	$1 \cdot 10^5$	-7,1
	<u>acido nucleico</u>				
Tirosil-tRNA sintetasi	tRNA ^{tyr}	$2,2 \cdot 10^8$ $1,4 \cdot 10^8$	11	$2 \cdot 10^7$ $2,6 \cdot 10^6$	-10,4 -9,1
Seril-tRNA sintetasi	tRNA ^{ser}	$2,1 \cdot 10^8$	11	$1,9 \cdot 10^7$	-10,3
Fenilalanil-tRNA sintetasi	tRNA ^{phe}	$1,6 \cdot 10^8$	27	$5,9 \cdot 10^6$	-9,6
	<u>Proteina</u>				
Tripsina	Inibitore della tripsina (basico)	$1 \cdot 10^6$	$6,6 \cdot 10^{-8}$	$1,5 \cdot 10^{13}$	-18,7
Tripsina	Inibitore della tripsina (pancrea- tica secretoria)	$6,8 \cdot 10^6$	$2,2 \cdot 10^{-4}$	$3,1 \cdot 10^{10}$	-14,9
<u>Ormone</u>					
Insulina	Insulina	$1,2 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^4$	$8 \cdot 10^3$	-5,5

Fig. 2-1

Grafico della titolazione della proteina P con il legante L. Le tre curve del grafico sono state costruite misurando la concentrazione del complesso PL e del legante L libero in una soluzione contenente una concentrazione costante della proteina P, alla quale vengono aggiunte progressivamente piccole quantità di L fino a raggiungere la saturazione della proteina.

I punti delle tre curve del grafico rappresentano rispettivamente le concentrazioni del complesso PL, delle molecole di P e di L libere, corrispondenti ai valori di L totali indicati in ascissa, quando la reazione di formazione di PL, da P ed L liberi, ha raggiunto l'equilibrio.

All'inizio della titolazione, data l'alta concentrazione di P rispetto a quella di L, la quasi totalità delle molecole di L si complessa con la proteina per dare PL e pochissime molecole di L rimangono libere.

Quindi ad ogni incremento di concentrazione di L corrisponde un incremento di concentrazione di PL. Questa è la fase lineare della curva di [PL], la quale per successivi incrementi di L totale ha un flesso. Il flesso indica che per gli stessi incrementi di L totale, si forma progressivamente meno complesso [PL] perchè la concentrazione della P libera è diminuita e la velocità di dissociazione del complesso PL è divenuta significativa. Occorre quindi un incremento maggiore di [L] per ottenere la formazione della stessa quantità di PL. Il flesso della curva PL prosegue tendendo asintoticamente verso il valore della concentrazione totale di P. In questa fase, per incrementi di concentrazione di L, si formano pochissime molecole del complesso PL perchè le molecole di P libere sono molto poche. In queste condizioni (freccia 2) si dice che la proteina è satura di legante. Si considera satura una proteina complessata oltre il 98% con il rispettivo legante. Per complessi reversibili nelle condizioni cellulari (vedere tab. 2-2), la saturazione del 100% non è raggiungibile anche se la proteina ha un'alta affinità per il legante, perchè il complesso PL è un equilibrio con P ed L liberi, ed un certo numero, anche se piccolissimo, di molecole di P libere deve esistere affinché esista il complesso [PL]. Se non ci sono molecole di P libere il complesso PL si dissocia per riformarle e ristabilire l'equilibrio.

Se non ci fosse uno stato di equilibrio e P ed L si associassero irreversibilmente, la proteina raggiungerebbe il 100% di saturazione (freccia 1) e l'andamento della concentrazione di PL in funzione di L totale sarebbe una retta (linea tratteggiata da O alla freccia 1).

Una proteina Q, presente in concentrazione uguale a quella di P ma con minore affinità per il legante L, avrebbe una curva di saturazione simile a quella della proteina P ma con una pendenza inferiore nella fase lineare, per cui la saturazione di Q avverrebbe a concentrazioni di L maggiori di quelle richieste per saturare P (cioè più a destra del punto 2), ma raggiungerebbe gli stessi valori di concentrazione di complesso QL perchè la concentrazione totale di Q è uguale a quella di P.

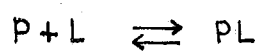
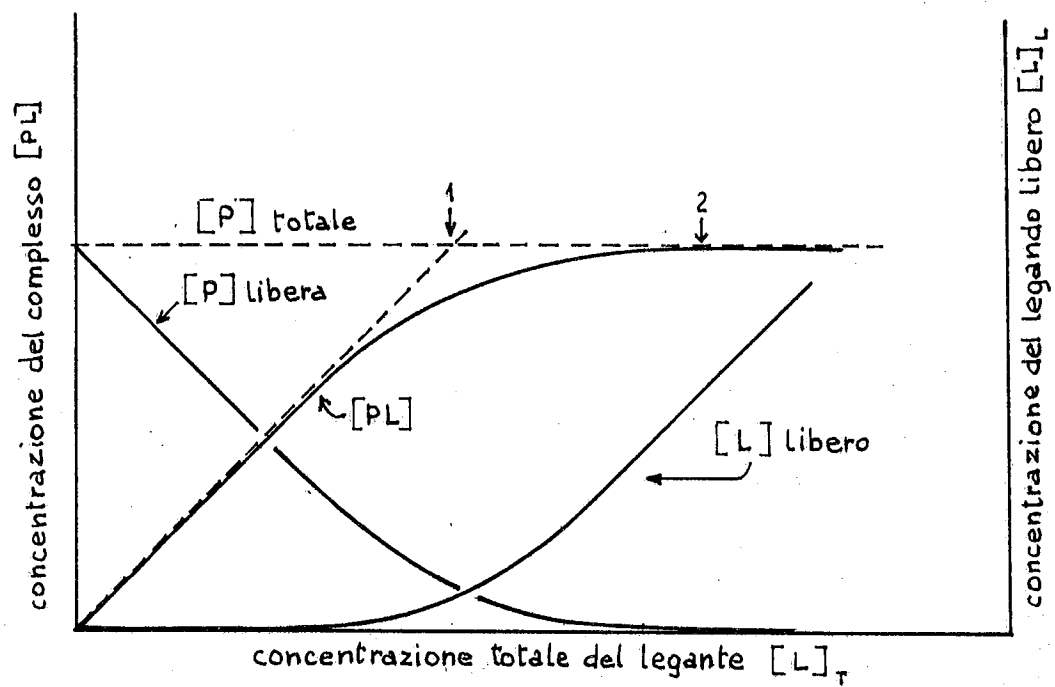


Fig. 2-1

Fig. 2-2

Formazione del complesso proteina-legante.

La figura a) schematizza l'associazione tra la proteina (P) ed il legante (L) costituito da una molecola con gruppi carichi e/o polari che formano legami a H con l'acqua. La figura è schematica e le dimensioni molecolari della proteina, del legante e dell'acqua non sono nelle giuste proporzioni.

La proteina ha gruppi carichi o polari sulla sua superficie che formano legami a H con l'acqua e conferiscono solubilità alla proteina stessa. Si è assunto che l'acqua non penetri nel sito di legame, anche se dotato di cariche, perchè trattenuta dalla rete di legami a H con se stessa e per la presenza di residui idrofobici nel sito di legame. La formazione del complesso procede con la dissociazione di L dalle molecole d'acqua (desolvatazione), poi con l'inserimento del legante nel sito di legame e formazione dei legami a idrogeno o salini tra legante ed i gruppi del sito di legame. La formazione del complesso PL ha una energia libera di attivazione costituita dall'energia necessaria per rompere i legami a H tra L e le molecole d'acqua e nella riduzione di entropia dovuta alla riduzione di libertà di movimento che hanno P ed L sotto forma di complesso. Il sito di legame di alcune proteine è idratato su uno o più gruppi. In questo caso, il meccanismo di formazione del complesso è simile a quello descritto sopra, ma richiede più energia perchè le molecole d'acqua legate al sito di legame devono essere rimosse per permettere l'accesso del legante. Questa energia è fornita dall'energia cinetica delle molecole, tuttavia incide negativamente sulla velocità di formazione del complesso.

La figura b) schematizza la formazione del complesso tra una proteina (P) ed un legante (L). La molecola L non ha cariche nè gruppi polari. Anche il sito di legame non ha cariche o gruppi polari al fine di poter interagire opportunamente con il legante formando una forte interazione idrofobica. Il legante e la proteina si incontrano casualmente, e per formare il complesso PL, è sufficiente che l'incontro avvenga con un corretto orientamento perchè la molecola di L essendo idrofobica, non interagendo con l'acqua, non chiede energia per dissociarsi da essa. Per le ragioni sopra esposte, si assume che la formazione di questo complesso abbia un valore di energia (entalpia) di attivazione inferiore a quella che la stessa molecola avrebbe se avesse anche gruppi polari o carichi. Se il legante apolare, invece di essere disperso molecularmente (come in figura), fosse associato in micelle (microgocce di lipidi), allora sarebbe richiesta altra energia per separarlo dalla micella. La diffusione dei soluti nell'acqua dipende dal calore che provoca vibrazioni e movimenti delle molecole. Un soluto idrofilo, pur formando alcuni legami a H con l'acqua, diffonde velocemente perchè i legami a H si formano e si rompono continuamente con velocità altissime (10^8 volte al secondo) per cui il soluto può muoversi rapidamente nell'acqua dissociandosi da alcune molecole d'acqua per interagire con altre fino a quando incontra con il giusto orientamento il sito di legame ed interagendo con questo

arresta la sua diffusione per un tempo più o meno lungo in relazione al numero e forza dei legami che ha fatto con il sito di legame. L'associazione di L a P è favorita anche per altri due motivi.

1. L'acqua preferisce formare il maggior numero di legami a H con se stessa formando una rete tridimensionale di legami a H (detta cristallo liquido) Questo cristallo è interrotto da qualsiasi molecola di soluto, anche polare, cioè si formano meno legami a H tra le molecole d'acqua, e si ha così una minore liberazione di energia libera. L'associazione di L a P riduce le rotture provocate da L al cristallo liquido.

2. Una molecola di soluto che si muove nell'acqua deve spostare le molecole d'acqua che si oppongono al suo movimento, creando volta volta la nicchia che lo deve contenere. Quando L incontra il sito di legame, trova la nicchia già pronta.

Se il legante è esclusivamente o prevalentemente idrofobico, l'effetto di esclusione del soluto da parte delle molecole d'acqua (effetto idrofobico) è esaltato perchè le molecole ed i gruppi atomici idrofobici, non formando legami a H con l'acqua, disturbano maggiormente il cristallo liquido e non sono trattenuti nel loro movimento. Tuttavia, anche il soluto idrofobico muovendosi deve spostare molecole d'acqua fino a quando incontra la nicchia idrofobica costituita dal sito di legame che lo accoglie. Tra legante e sito di legame si ha l'interazione idrofobica cioè la tendenza a stare uniti perchè la rete tridimensionale di legami a H dell'acqua si oppone alla dissociazione di L, inoltre tra L e sito di legame possono agire le forze di Van der Waals.

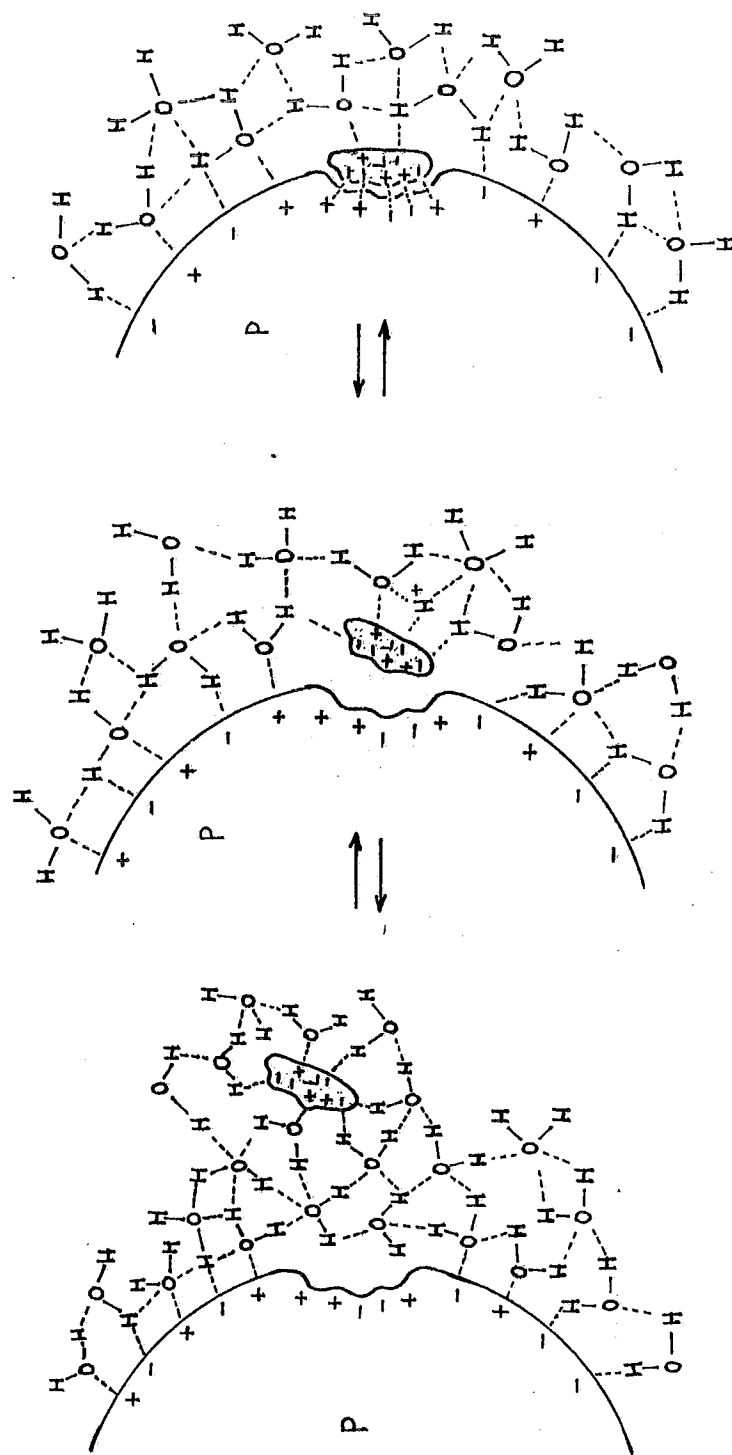


Fig. 2-2 a

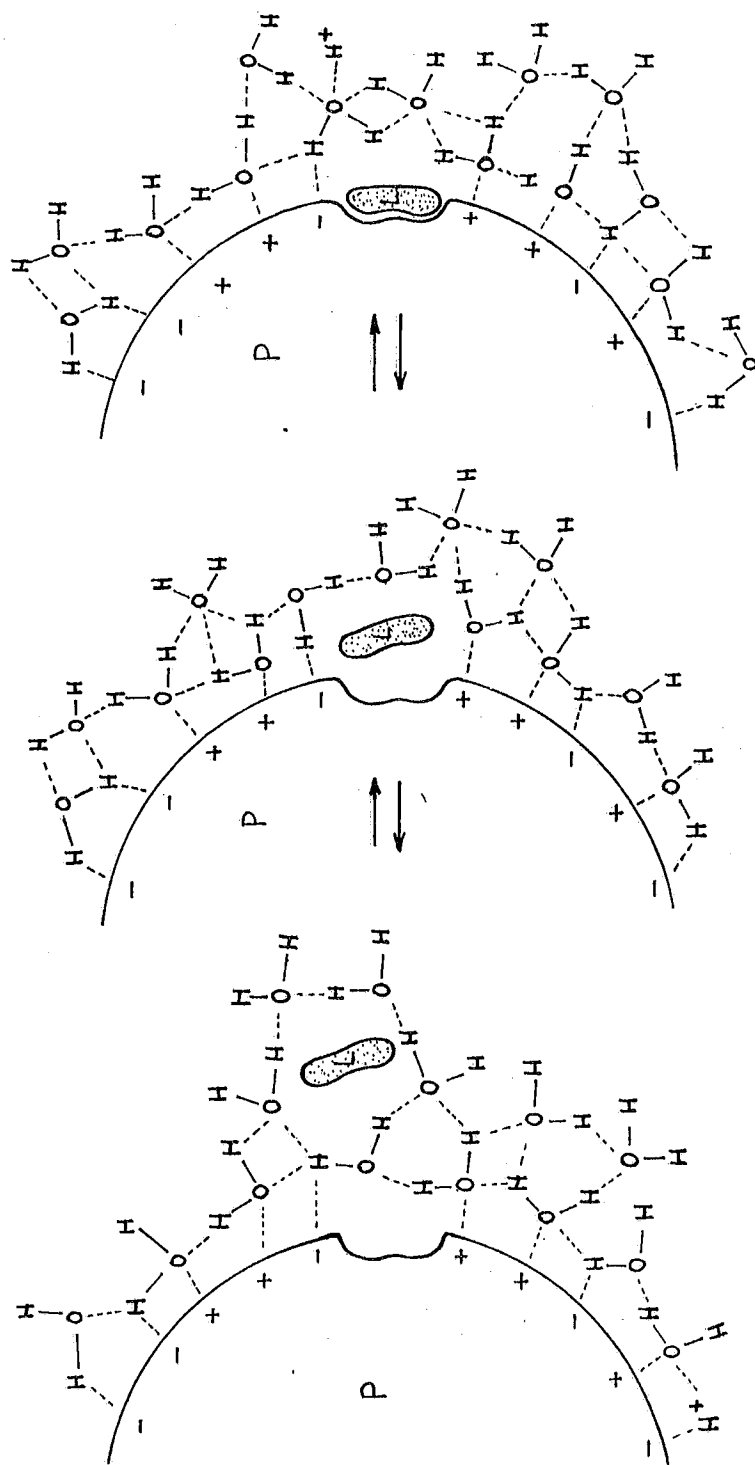


Fig. 2-2 (b)

Fig. 2-3

In figura sono indicati i diagrammi energetici di tre reazioni di formazione di complessi proteina-legante (PL). Le reazioni hanno valori di energia libera di formazione (ΔG°) diversi tra loro.

- | | |
|--|-----------------|
| a) $\Delta G^\circ = -14,19$ kcal/mole | $K_a = 10^{10}$ |
| b) $\Delta G^\circ = -4,26$ kcal/mole | $K_a = 10^3$ |
| c) $\Delta G^\circ = 0$ kcal/mole | $K_a = 1$ |

Le reazioni in a) e b) hanno ΔG° di formazione minore di zero, quindi partendo dalle condizioni standard, la reazione procede verso la formazione del complesso. Dato che il valore dell'energia libera di attivazione per la formazione del complesso ($\Delta G^\circ_{\rightarrow}$) è piccolo ($1+2,5$ Kcal/mole), l'energia libera di attivazione per la dissociazione del complesso ($\Delta G^\circ_{\leftarrow}$), ha un valore molto vicino a quello del ΔG° di formazione (ΔG°).

$$\overrightarrow{\Delta G^\circ} - \overleftarrow{\Delta G^\circ} = \Delta G^\circ$$

$$\overleftarrow{\Delta G^\circ} = \Delta G^\circ + \sim 2$$

Il valore del ΔG° di formazione da con buona approssimazione la misura della stabilità e dell'inerzia a dissociarsi del complesso PL. In a) e b) il complesso PL è ad un livello di energia libera inferiore di quello dei suoi componenti P ed L liberi, e quindi è dotato di stabilità, la sua velocità di dissociazione è inferiore a quella della sua formazione e cioè ha un'inerzia a dissociarsi maggiore di quanta ne abbia a formarsi. Ciò risulta in $K_a > 1$. L'energia libera di attivazione per la dissociazione del complesso, ha un valore maggiore dell'energia di attivazione per la formazione del complesso, tuttavia questi valori possono essere egualmente raggiunti alla temperatura di 37°C . Quindi nelle cellule la dissociazione dei complessi ad alta stabilità come in a), può procedere spontaneamente a velocità relativamente alte senza l'intervento di catalizzatori.

La reazione di associazione in c) ha un ΔG° di formazione uguale a zero ($K_a=1$), le condizioni standard sono anche di equilibrio perchè il complesso PL ha lo stesso livello energetico delle molecole dissociate. Le velocità di formazione e dissociazione del complesso sono uguali ed hanno valori alti dato che i valori dell'energia libera di attivazione della reazione di formazione e di dissociazione sono uguali e molto piccoli. Anche se all'equilibrio si ha la presenza di un numero di complessi PL uguale a quello delle molecole di P e di L libere, i complessi PL sono considerati inesistenti dato l'alta velocità della loro dissociazione (vedere tabella 2-2).

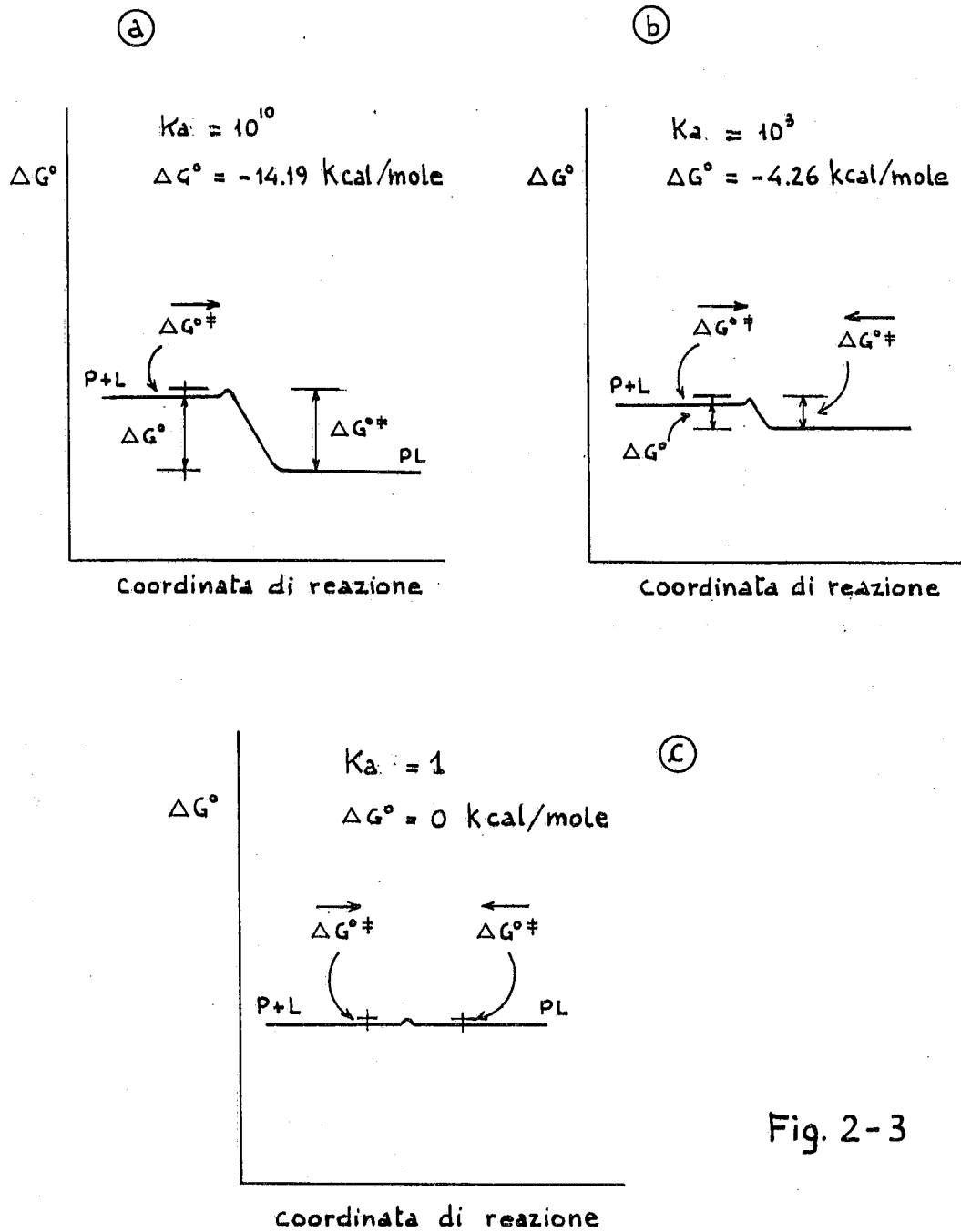


Fig. 2-3

Fig. 2-4

Formazione di tre complessi proteina legante aventi rispettivamente differenti valori di stabilità. In figura sono indicate le reazioni di formazione di tre complessi che una stessa proteina P dotata di specificità relativa forma con tre leganti L_1 , L_2 , ed L_3 aventi rispettivamente $K_a = 10^{10}$, 10^3 , e 1 a cui corrispondono rispettivamente valori di ΔG° di formazione di -14,2 , -4,26 e 0 kcal/mole a 37°C.

Le tre reazioni sono rappresentate in a, b, c con la formazione di un singolo complesso ed in am, bm e cm rispettivamente, le stesse reazioni sono rappresentate con una molteplicità di molecole di P ed L liberi e di complessi PL in condizioni standard ed in condizioni di equilibrio raggiunto dalle condizioni standard. I profili della variazione di energia libera delle tre reazioni sono indicati in fig. 2-3. L'abbinamento delle sei figure ha lo scopo di mostrare che: 1) maggiore è la corrispondenza delle superfici di contatto tra sito di legame e legante, e maggiore è il numero di legami deboli che si formano tra P ed L (a, b, c); 2) maggiore è il numero di legami deboli che si formano tra P ed L, maggiore è la quantità di energia libera ceduta nella formazione del complesso (vedere anche fig. 2-3 e tab. 2-2); 3) maggiore è la quantità di energia libera ceduta nella formazione del singolo complesso, maggiore è il numero di molecole di proteina che si trovano nella forma complessa (am,bm,cm) e quindi risulta maggiore il valore delle rispettive K_a .

Per rendere più semplice il disegno, in a,b,c la proteina ed il legante sono disegnati in sezione, ed i legami deboli indicati con tratti sottili tra P ed L. Per difficoltà di disegno, nelle figure am e cm la proporzione tra il numero di complessi e le molecole di P ed L liberi in condizioni di equilibrio non sono quelli reali. In condizioni di equilibrio, in am sono rappresentati 28 complessi PL ed una molecola di P ed una di L libere, mentre si dovrebbero avere 141372 complessi PL per ogni P ed L liberi.

All'equilibrio:

$$\frac{[PL]}{[PL][L]} = 10^{10} = \frac{1.999}{1.414 \cdot 10^{-5} \cdot 1.414 \cdot 10^{-5}}$$

$$\frac{[PL]}{[P]} = \frac{1.999}{1.414 \cdot 10^{-5}} = 141.372$$

In bm all'equilibrio sono indicate 20 molecole di complesso ed 8 libere. In realtà all'equilibrio le molecole di PL dovrebbero essere 44 ed una sola di P libera.

In cm il rapporto tra il numero di complessi PL e P o L liberi è uguale ad 1, sia in condizioni standard che all'equilibrio.

In a,b,c lo spessore delle frecce indica la velocità delle reazioni di associazione e di dissociazione tra P ed L,

all'inizio delle condizioni standard. Nelle condizioni standard, essendo P, L e PL presenti tutti in concentrazioni 1 M, il rapporto tra le velocità di associazione e quello di dissociazione è uguale alla K_a (K_{eq}) della reazione di associazione, e quindi uguale al rapporto delle costanti cinetiche k_1 e k_2 .

In condizioni standard, la velocità di formazione del complesso PL è quella che si osserverebbe avendo P ed L ambedue in concentrazione 1 M in assenza di complessi PL, ed analogamente la velocità di dissociazione del complesso è quella osservabile in presenza di 1 M PL in assenza di P ed L liberi. Dalla differenza delle due velocità si ha il valore della velocità netta di formazione del complesso PL. Le velocità della reazione diretta (V_1) e di quella inversa (V_2) sono:

$$V_1 = [P][L]k_1 \quad V_2 = [PL]k_2$$

In condizioni standard: $[P] = [L] = [PL] = 1 \text{ M}$

$$\frac{V_1}{V_2} = \frac{k_1}{k_2}$$

Poste in condizioni standard le reazioni a,b,c avranno rispettivamente la velocità di formazione a) 10^{10} volte maggiore, b) 10^3 volte maggiore, c) uguale alle rispettive velocità di dissociazione del complesso.

I diagrammi energetici delle reazioni a,b,c, illustrati rispettivamente in a,b,c, di fig. 2-3 mostrano i valori delle energie di attivazione delle tre reazioni. Questi valori sono tali che è sufficiente l'energia fornita dall'agitazione delle molecole per poterli superare nei due sensi di reazione.

In cm è rappresentata la reazione con $K_a = 1$ ($\Delta G^\circ = 0 \text{ kcal/mole}$), essa è particolare perchè le condizioni standard sono per questa reazione anche le condizioni di equilibrio, la k_1 è uguale alla k_2 ed il loro rapporto è uguale ad 1, ed anche il quoziente di reazione è uguale ad 1. La velocità di formazione del complesso e quella della sua dissociazione, sono uguali tra loro e molto alte in relazione al fatto che l'energia di attivazione ha lo stesso valore nei due sensi della reazione ed ha anche un valore molto basso (fig. 2-3). Da ciò risulta che i complessi PL schematizzati in c e cm hanno una vita brevissima, e devono considerarsi inesistenti e non utilizzabili per una funzione biologica. In c è indicato che il complesso è stabilizzato da 2 legami deboli. I due legami deboli liberano una quantità di energia libera equivalente all'energia spesa per dissociare il legante dall'acqua e addizionata del decremento (risulta positivo avendo davanti il segno meno) di entropia costituito dal maggior ordine del complesso PL rispetto a P ed L liberi. In am è rappresentata la reazione con $K_{eq} = 10^{10}$. Partendo dalle condizioni standard la reazione procederà verso la formazione del complesso con una velocità che è 10^{10} volte superiore a quella della sua dissociazione. Questa velocità è anche molto alta in valore assoluto perchè la reazione di

formazione del complesso PL ha una bassa energia di attivazione (vedere fig. 2-3a).
 Con il procedere, la velocità della formazione del complesso rallenta progressivamente e quella della dissociazione del complesso aumenta fino a quando, raggiunto l'equilibrio, le due velocità si annullano perchè la concentrazione di P ed L liberi sono diminuite, e quelle di PL talmente aumentate da annullare il rapporto di valore delle costanti cinetiche della reazione.

All'equilibrio:

$$V_1 = [P][L]k_1 = V_2 = [PL]k_2 \quad [P][L] \cdot 10^8 = [PL] \cdot 10^{-2}$$

$$1.414 \cdot 10^{-5} \cdot 1.414 \cdot 10^{-5} \cdot 10^{18} = 1.999 \cdot 10^{-2}$$

$$\frac{[PL]}{[P][L]} = \frac{1.999}{1.414 \cdot 10^{-5} \cdot 1.414 \cdot 10^{-5}} = 10^{10} = K_a$$

Il valore della K_a è quindi il valore del quoziente di reazione (rapporto tra la concentrazione di PL ed il prodotto delle concentrazioni di P ed L liberi) quando la reazione è all'equilibrio, inoltre il valore della K_a è il valore del rapporto delle costanti cinetiche della reazione di formazione del complesso PL (k_1) e della costante cinetica della reazione di dissociazione dello stesso complesso PL (k_2). Quando la reazione è in condizioni standard, il rapporto tra la velocità di formazione e quella di dissociazione del complesso, è uguale al rapporto delle costanti cinetiche dato che P, L e PL sono in concentrazioni molari unitarie e quindi non cambiano il valore del rapporto.

Quindi in condizioni standard:

$$K_a = \frac{V_1}{V_2} = \frac{k_1 \cdot 1M PL}{k_2 \cdot 1M P \cdot 1M L} = \frac{k_1}{k_2}$$

All'equilibrio la K_a è data dal quoziente di reazione:

$$V_1 = V_2 \quad V_1 = k_1 [P][L] \quad V_2 = k_2 [PL]$$

$$k_1 [P][L] = k_2 [PL]$$

$$\frac{k_1}{k_2} = \frac{[PL]}{[P][L]} \quad K_a = \frac{[PL]}{[P][L]}$$

In condizioni diverse da quelle indicate il rapporto delle velocità ed il quoziente di reazione non hanno il valore della K_a . Se escludiamo il caso di reazioni con $K_a = 1$ che sono all'equilibrio in condizioni standard, per le altre reazioni, partendo dalle condizioni standard, all'inizio il quoziente di reazione è uguale ad 1 ed il rapporto V_1/V_2 ha il massimo valore (nelle reazioni esergoniche) ed il suo minimo valore (nelle reazioni endoergoniche). Da questo punto la reazione procede verso l'equilibrio e lo raggiunge

quando il quoziente di reazione ha il valore della K_a e il rapporto V_1/V_2 è 1.

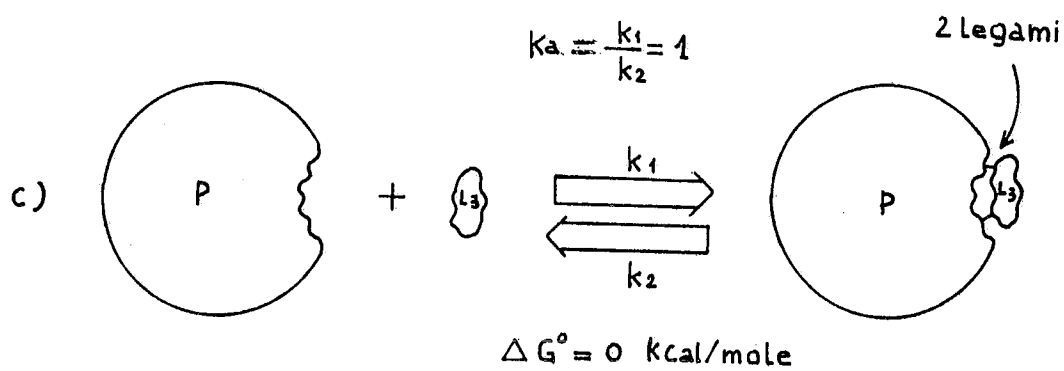
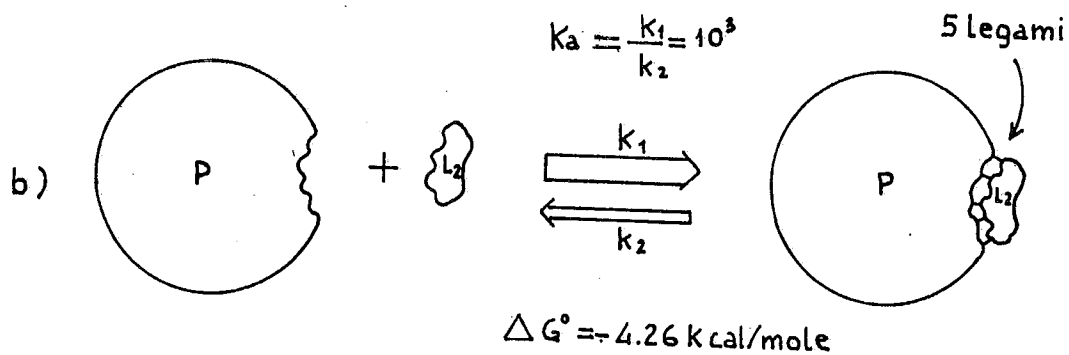
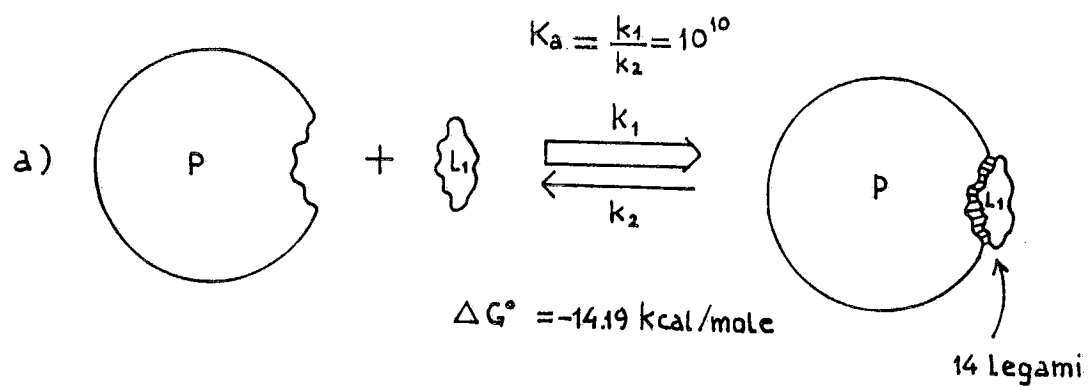
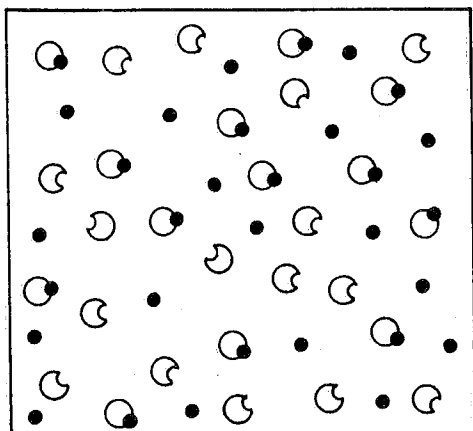


Fig. 2-4

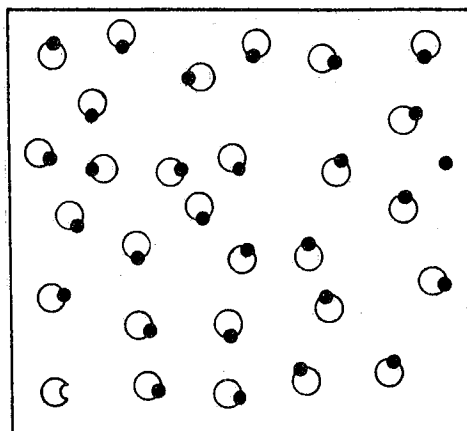
Fig. 2-4

condizioni standard

equilibrio

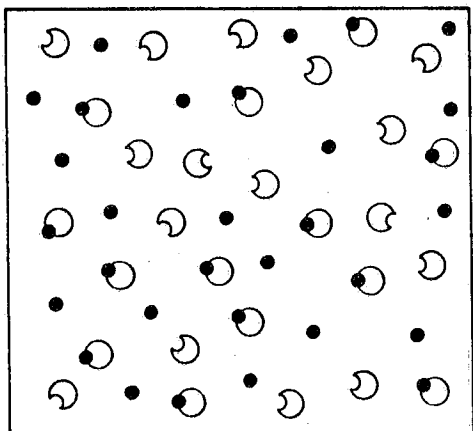


(a)

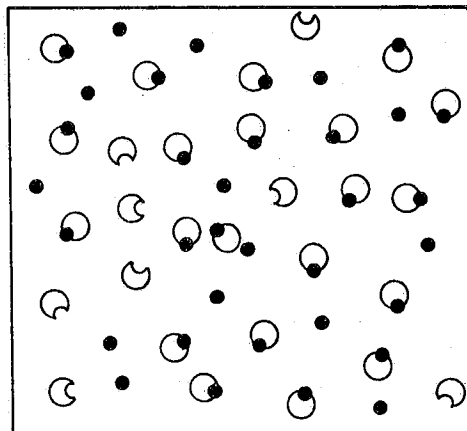


$$\frac{[PL]}{[P][L]} = \frac{1M}{1M \cdot 1M} = 1; \frac{[PL]}{[P]} = 1$$

$$K_{aff} = \frac{[PL]}{[P][L]} = 10^{10} \quad \frac{n^{\circ} PL}{n^{\circ} P} = \frac{141372}{1}$$

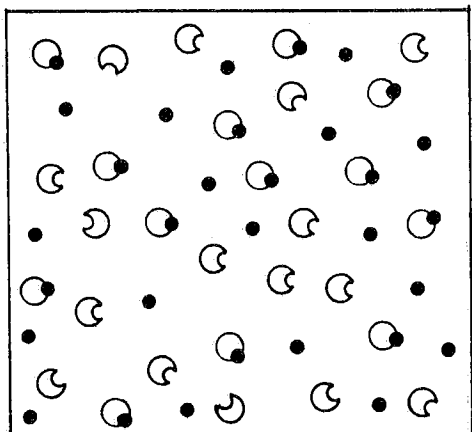


(b)

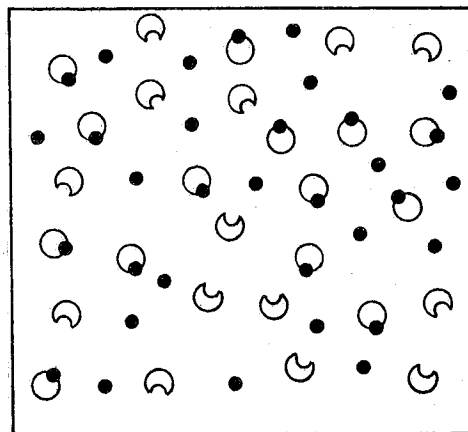


$$\frac{[PL]}{[P][L]} = \frac{1M}{1M \cdot 1M} = 1 \quad \frac{[PL]}{[P]} = 1$$

$$K_{aff} = \frac{[PL]}{[P][L]} = 10^3 \quad \frac{n^{\circ} PL}{n^{\circ} P} = \frac{44}{1}$$



(c)



$$\frac{[PL]}{[P][L]} = \frac{1M}{1M \cdot 1M} = 1$$

$$K_{aff} = \frac{[PL]}{[P][L]} = 1 \quad \frac{n^{\circ} PL}{n^{\circ} P} = \frac{1}{1}$$

Fig. 2-5

In figura sono indicati i diagrammi energetici di tre reazioni di associazione tra una proteina P ed un legante L (a,c,e) e di tre reazioni covalenti con 2 reagenti AA e BB e 2 prodotti identici AB (b,d,f).

Le figure hanno lo scopo di mettere in evidenza le differenze di energia libera di attivazione esistenti tra reazioni di associazione proteina-legante e reazioni covalenti aventi lo stesso valore di energia libera di reazione (ΔG°).

In a e b sono rispettivamente mostrati i profili dell'energia libera di una reazione di associazione tra proteina e legante e di una reazione covalente, aventi ambedue un ΔG° di reazione di $-4,26$ kcal/mole a 37°C , che corrisponde ad una $K_{eq} = 10^3$. Lo stesso valore di ΔG° di reazione ci dice che partendo dalle condizioni standard (1M P, 1M L, 1M PL, 1M AA, 1M BB, 1M AB), le reazioni procederanno ambedue verso destra fino a raggiungere l'equilibrio dove il quoziente di reazione sarà per ambedue uguale a 10^3 . Questo valore di quoziente di reazione si verificherà sempre anche partendo da concentrazioni di reagenti o prodotti diverse dalla molarità, tuttavia l'energia libera rilasciata per raggiungere l'equilibrio sarà diversa dal valore di $-4,26$ kcal.

Le due reazioni a e b hanno valori molto diversi di energia di attivazione della reazione diretta ($\Delta G^{\circ\ddagger}$) e della reazione inversa ($\Delta G^{\circ\ddagger}$). La reazione di associazione ha un $\Delta G^{\circ\ddagger}$ che si assume intorno a $+2$ kcal/mole, la reazione covalente ha $\Delta G^{\circ\ddagger} = +60$ kcal/mole. La reazione di dissociazione del complesso PL ha un $\Delta G^{\circ\ddagger}$ di circa $+6,26$ kcal/mole e la reazione covalente inversa ha $\Delta G^{\circ\ddagger}$ di $+64,26$ kcal/mole. Risulta così che la differenza tra i valori dell'energia di attivazione della reazione inversa e di quella diretta, in ambedue i casi da lo stesso valore di $\Delta G^\circ = -4,26$ Kcal/mole e da ciò risulta che i rapporti delle costanti cinetiche delle due reazioni hanno lo stesso valore e quindi anche le K_{eq} delle due reazioni avranno lo stesso valore.

La diversità del valore assoluto della energia libera di attivazione della reazione di associazione tra proteina e legante (a) e la reazione covalente (b), determina una grande differenza nella velocità con cui le due reazioni, di associazione del complesso PL e covalente, raggiungono l'equilibrio partendo ad esempio dalle condizioni in cui sono presenti solo i reagenti. Infatti l'energia di attivazione per la formazione del complesso proteina-legante, costituisce una piccola barriera energetica all'associazione tra P ed L che è superata dall'energia termica delle molecole a 37°C , mentre l'energia libera di attivazione della reazione covalente è talmente alta a 37°C che, in assenza di catalizzatori, la reazione è altamente improbabile.

Quindi per l'energia libera, che viene perduta per raggiungere l'equilibrio, le due reazioni (a e b) sono indistinguibili, ma cineticamente sono molto diverse. La reazione di associazione raggiungerà in tempi brevi (ad es. frazioni di secondo) l'equilibrio, mentre alla reazione

covalente, se non catalizzata, occorreranno tempi molto più lunghi (ad es. ore, mesi o anni).

L'energia di attivazione per la dissociazione del complesso PL ha anch'essa un valore relativamente basso, per cui il complesso tenderà a dissociarsi spontaneamente con velocità relativamente alte per azione dell'agitazione termica delle molecole, mentre i prodotti della reazione covalente possono riformare prodotti in tempi molto più lunghi.

Quindi il complesso PL si forma velocemente, ed essendo dotato di una certa stabilità ($\Delta G^\circ = -4,26$ kcal/mole), si dissocia con velocità inferiore a quella con cui si forma. Tuttavia questa velocità è alta se comparata con la velocità delle reazioni covalenti, perchè l'energia libera per la dissociazione del complesso è inferiore all'energia libera di attivazione della reazione covalente. Considerando tempi lunghi, la reazione covalente procede nei due sensi, tuttavia nelle condizioni dei fluidi biologici bisogna considerare i suoi reagenti e prodotti completamente inerti per una funzione metabolica.

In c) e d) sono mostrati i diagrammi energetici di una reazione di associazione tra proteina e legante (c) e di una reazione covalente (e) che sono in equilibrio in condizioni standard. Quindi ambedue le reazioni non procedono verso destra, né verso sinistra. La differenza tra le due reazioni è solo cinetica e l'equilibrio di c sarà molto più dinamico di quello d. Per tempi relativamente brevi (frazioni di secondo), solo l'equilibrio di c deve essere considerato dinamico. Infatti se aggiungessimo reagenti alla reazione in c, essa si riequilibrerebbe in tempi brevi; facendo la stessa cosa per la reazione in d, i tempi sarebbero molto lunghi come quelli indicati per la reazione b.

Tra reazione di associazione P-L e reazione covalente all'equilibrio in condizioni standard esiste un'altra notevole differenza. Mentre il prodotto AB è stabile per tempi lunghi, il complesso PL è altamente instabile avendo una velocità di dissociazione alta ed uguale a quella di associazione. Data l'alta velocità di formazione e di dissociazione, il complesso PL è da considerarsi inesistente ed incapace ad assolvere funzioni biologiche, così come, per ragioni opposte, è considerata inesistente nella cellula la velocità delle reazioni covalenti non catalizzate (vedere figg. 2-3, 2-4 e testo cap.1).

In e) è mostrato il diagramma energetico della reazione per la formazione di un complesso molto stabile ($\Delta G^\circ = -23$ kcal/mole) che si assume non si dissocia nelle condizioni dei fluidi biologici per lunghi tempi (anni). La reazione (e) raggiungerà rapidamente l'equilibrio dato il basso valore dell'energia libera di attivazione per la formazione del complesso, mentre il complesso non si dissocierà spontaneamente perchè occorre fornire $+24$ kcal/mole $= \Delta G^\circ \ddagger$, per separare P ed L. Questa quantità di energia libera è molto al di sopra di quella che può fornire l'agitazione molecolare, per cui è altamente improbabile che P ed L si separino, ed il complesso PL deve essere considerato inerte nelle condizioni cellulari. Per la reazione covalente (f) valgono le stesse considerazioni fatte per la reazione covalente (b).

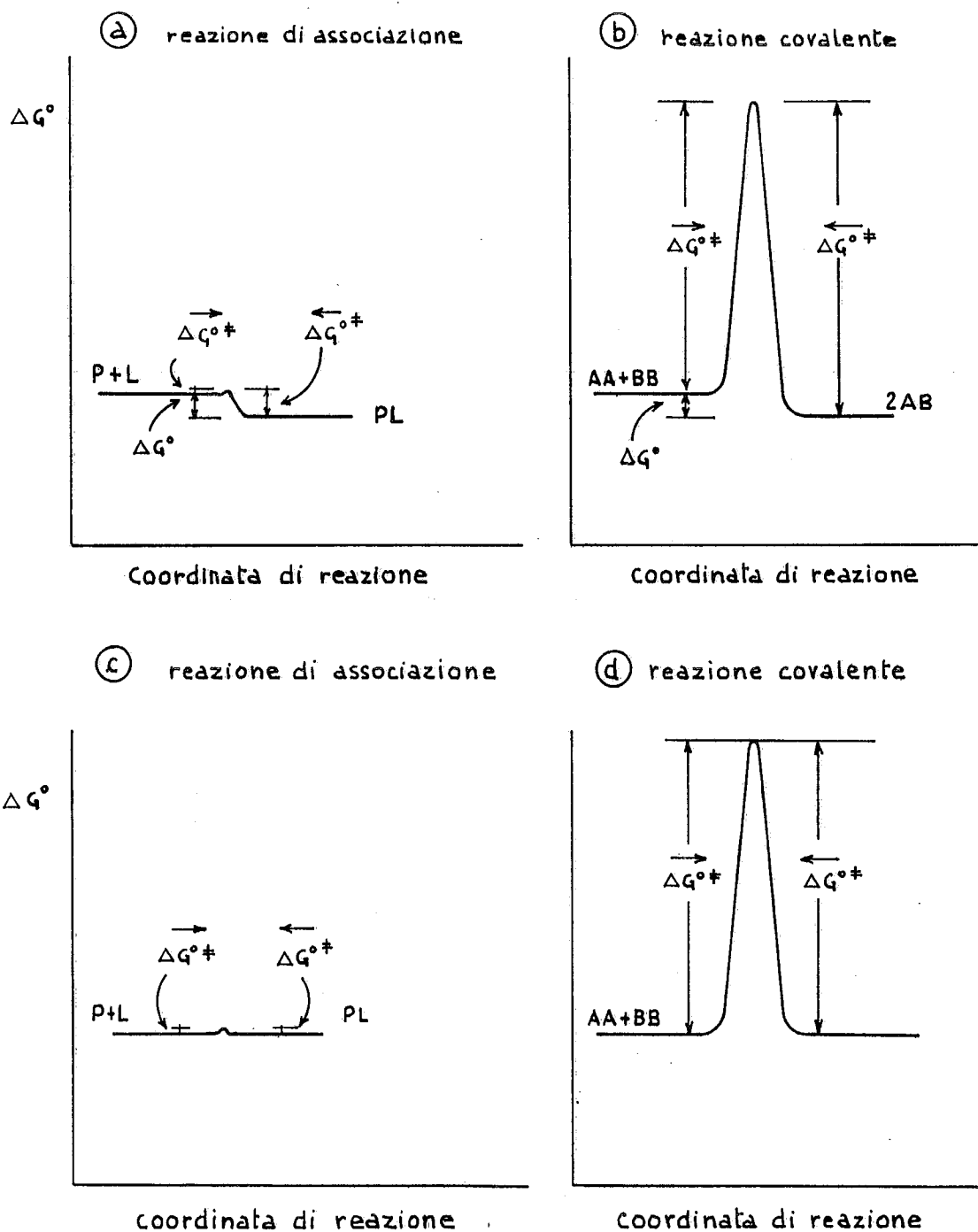
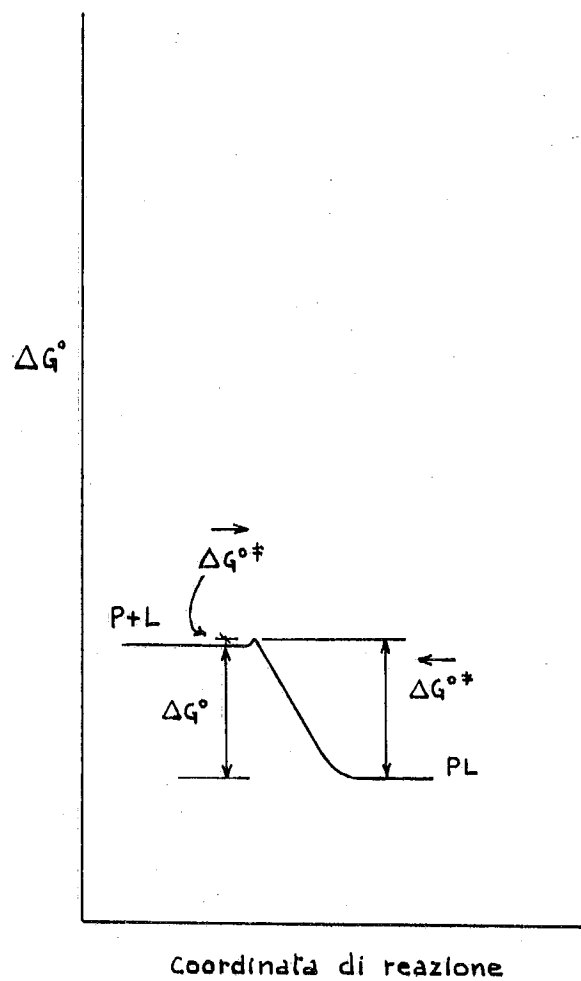


Fig. 2-5

⑤ reazione di associazione



⑥ reazione covalente

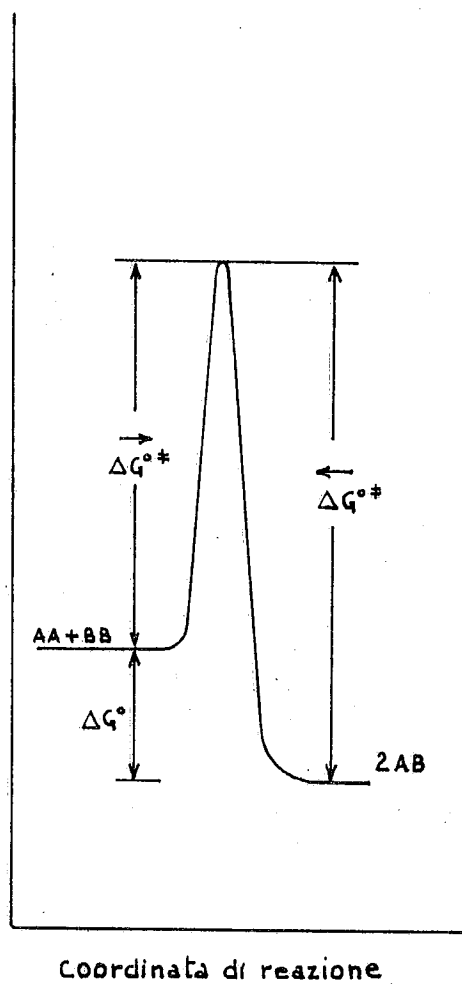


Fig. 2-5

Fig. 2-6

Relazione tra il numero dei legami a H e salini che stabilizzano i complessi di proteine e leganti aventi molecole prevalentemente idrofile e la K di associazione. (figura a) da Arnone, Nature 237, 147-149, 1972; figura d) da Pai ed altri, Nature 341, 209-214, 1989; anbedue le figure ridisegnate. Altri dati da: Quioco e Vyas, Nature, 310, 381-386, 1984; Sigal ed altri, Proc. Natl. Acad. Sci. Usa, 83, 952-956, 1986; Manne ed altri, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 6953-6957, 1954).

I legami salini sono indicati con linee punteggiate. Ara-Bp = proteina che lega L-arabinosio; Hb = Emoglobina; Ras = proteina che lega il GTP; Ras-Ala¹¹⁹ = mutante con ASP¹¹⁹ sostituito con Ala; G-C = guanosina e citosina appaiate in un doppio filamento nucleotidico.

a - Emoglobina umana adulta (HbA)

b - Emoglobina umana fetale (HbF). HbF ha le subunità β sostituite con le subunità γ che hanno una serina al posto dell'istidina β 143, gli altri residui che interagiscono con il DPG sono gli stessi delle subunità β .

c - Emoglobina di pecora. L'istidina β 2 manca per delezione, l' α -NH₃⁺ terminale della valina β 1 risulta spostato e non può interagire con il DPG. Si ha quindi la perdita di 4 legami salini (2 per ogni subunità β).

d - GTP associato alla proteina Ras. I legami deboli tra la proteina Ras ed il GTP sono numerati (da 1 a 10). Le frecce scure indicano i legami a H).

e - Il grafico è costruito in base al numero dei legami a H e/o salini, del valore del ΔG° della reazione di associazione tra proteina e legante. Il numero dei legami che stabilizzano il complesso è dedotto dalla struttura tridimensionale del sito di legame complessato con il legante di proteine naturali e mutate mancanti in uno o più residui aminoacidici interagenti con il legante.

La possibilità di avere il ΔG° di proteine naturali e mutate di uno o due residui ha permesso di calcolare l'energia di un singolo legame a H o salino.

La proteina Ras forma con il GTP 10 legami deboli (8 legami a H, 2 di coordinazione) liberando circa 11 kcal/mole.

La proteina mutata Ras-Ala¹¹⁹ forma con il GTP 6 legami a H e 2 di coordinazione liberando circa 9,5 kcal/mole.

Sottraendo il ΔG° di associazione della proteina mutata da quello della proteina naturale. I valori ottenuti durante lo stesso gruppi di esperimenti sono:

$$(-11,35) - (-9,5) = -1,85 \quad -1,85 : 2 = -0,925$$

L'energia libera media di un singolo legame a H risulta essere -0,925 kcal/mole..

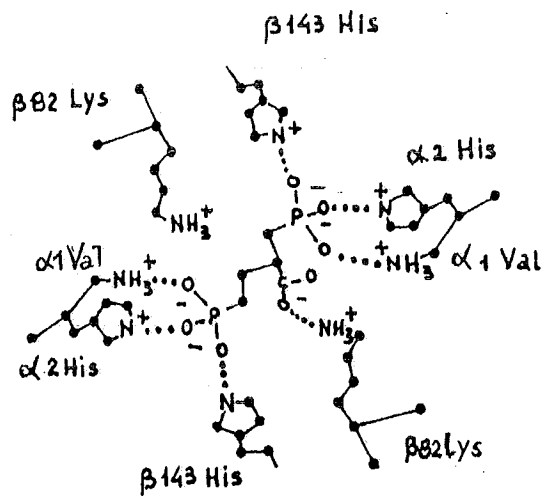
Un analogo calcolo fatto con dati relativi ai complessi HbA e HbF, rispettivamente stabilizzati da 7 e 5 legami a H-salini ed aventi ΔG° di associazione -7,1 e -5,67 kcal/mole.

$$(-7,1) - (-5,67) = -1,43 \quad -1,43 : 2 = -0,715$$

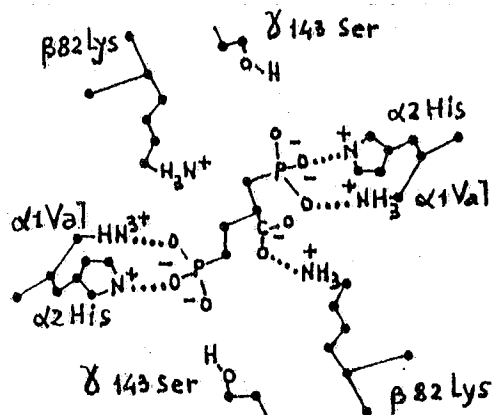
L'energia libera media di un singolo legame H-salino risulta essere -0,715 kcal/mole

Il grafico riporta il valore dell'energia libera rilasciata dai legami ad H che tengono unite basi puriniche e pirimidiniche appartenenti a oligonucleotidi costituiti da 5-6 basi. Questo valore è stato calcolato sottraendo dall'energia libera totale che tiene unita una coppia di basi, l'energia libera di impilamento delle basi una sull'altra (stacking). L'energia libera di impilamento è data da interazioni dipolo-dipolo e da forze di Van der Waals che si instaurano tra una base e quella ad essa soprastante e quella sottostante. Per i tre legami a H che si formano tra una coppia di basi G-C i calcoli danno un valore medio complessivo di -3kcal/mole ed un ugual valore per l'impilamento. Tuttavia l'energia libera di accoppiamento di G-C è in genere inferiore a -6kcal/mole , varia tra $-0,3$ e -5kcal/mole . Ciò risulta dal fatto che la migliore disposizione per formare i legami a H è diversa da quella per avere il migliore impilamento delle basi. Quindi i due tipi di interazioni sebbene cooperino per mantenere l'accoppiamento in parte si contrastano per mantenere strutture leggermente diverse e ciò risulta in una perdita parziale della loro energia libera. A conferma di ciò ci sono altri dati indicanti che l'energia di accoppiamento delle basi varia in relazione al tipo delle basi accoppiate, alla sequenza delle basi ed alla disposizione nello spazio dell'oligonucleotide.

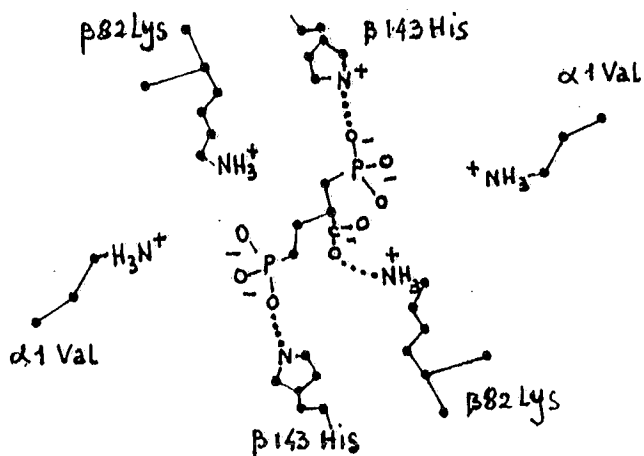
E' necessario ricordare che sebbene -1kcal/mole sia il valore di un singolo legame a H o H-salino più frequentemente riscontrato, per gli stessi tipi di legame sono stati riportati valori che si discostano molto da quel valore (vedere tab. 2-1). Questa variabilità dipende dal fatto che ogni specie molecolare di proteina ha un diverso sito di legame e che la struttura del sito di legame condiziona la distanza e l'angolo dei legami che forma con il legante.



HbA
DPG $K_a \approx 10^5$
7 legami salini



HbF
DPG $K_a \approx 10^4$
5 legami salini



Hb di pecora
DPG $K_a \approx 0?$
3 legami salini

Fig. 2-6

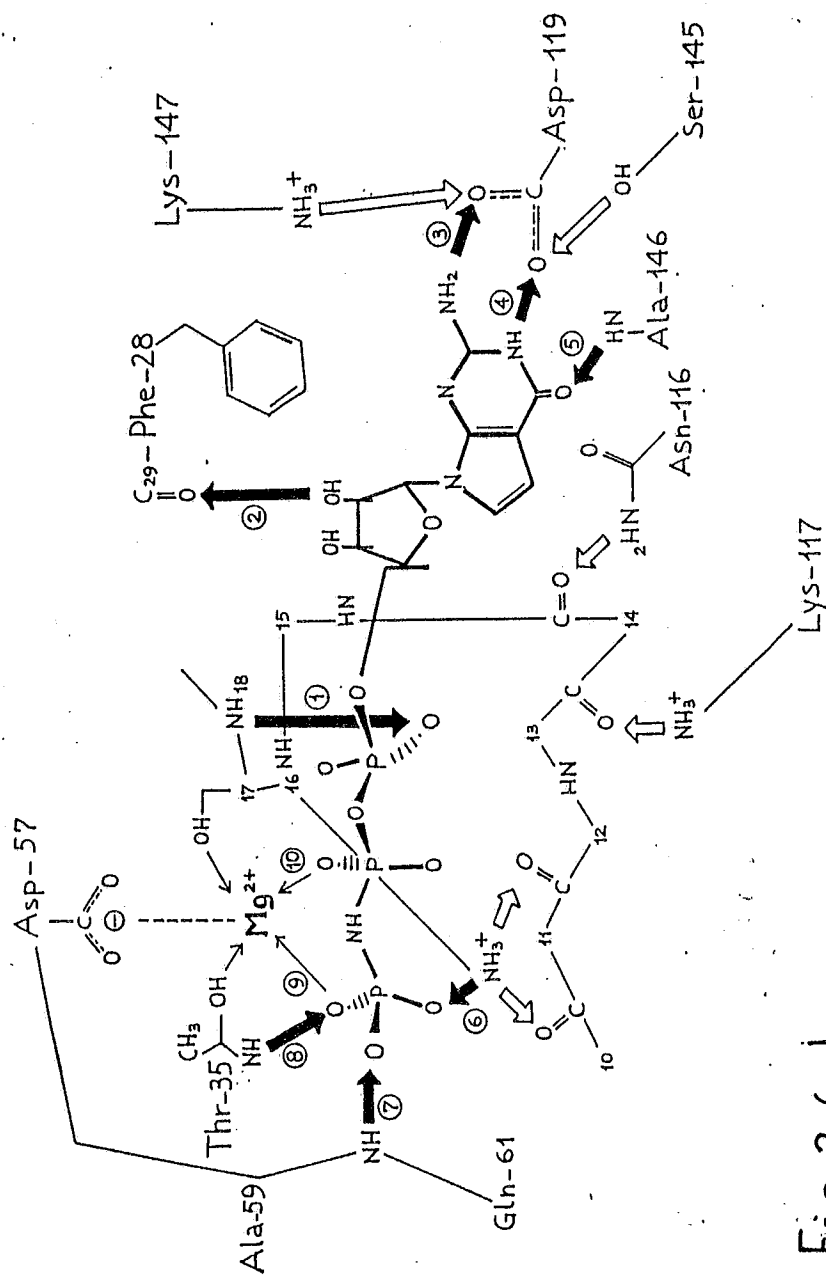


Fig 2-6d

Fig. 2-6 e

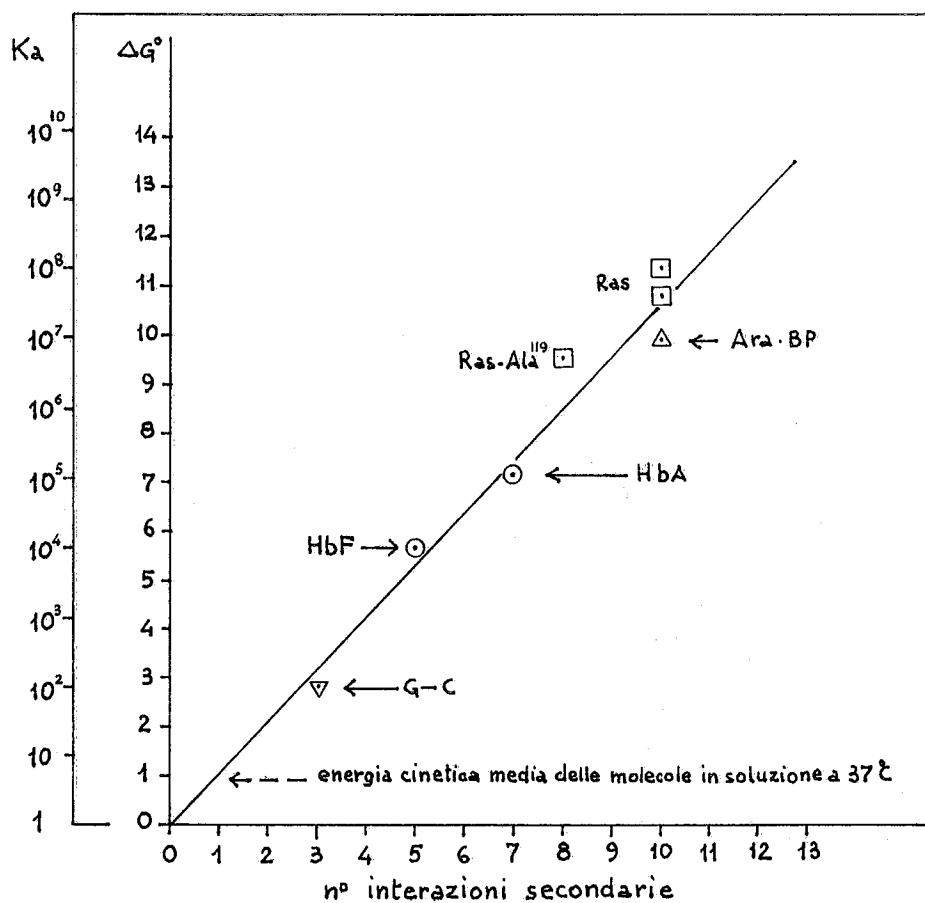


Fig. 2-7

Specificità assoluta e relativa.

A, B, C, D, E, sono composti aventi molecole simili ma non identiche. A, B, C, sono metaboliti, normali costituenti cellulari; D ed E sono composti sintetici non naturali (ad es. farmaci).

In a, b, c, è mostrato il sito di legame della proteina SA dotata di specificità assoluta; in c, d, e, f, g, h, è mostrato il sito di legame della proteina SR dotata di specificità relativa. La proteina SA ha specificità assoluta verso il metabolita A che lega con tre legami salini, non lega i metaboliti B e C a causa di un gruppo idrofobico (indicato come O), che impedisce stericamente l'associazione; inoltre non lega il composto sintetico D per la presenza di un gruppo carico positivamente che viene respinto dal gruppo carico positivamente presente al centro nel sito di legame. La proteina SA lega invece E perchè esso è simile ad A nella parte che interagisce col sito di legame di SA. Quindi SA ha specificità assoluta se esposta solo a metaboliti cellulari, il suo sito di legame è sufficientemente specifico da riconoscere anche composti sintetici, ma non tutti.

La proteina SR lega i tre metaboliti cellulari A, B, C con quattro legami salini, e B anche con un legame idrofobico. La proteina SR avendo il sito di legame con una struttura capace di legare i tre composti normali costituenti cellulari, ha anche la capacità di legare i composti di sintesi D ed E. L'affinità di SR per E è scarsa data la scarsa complementarità di forma di E per il sito di legame di SR che non permette di formare 3 legami salini più corti.

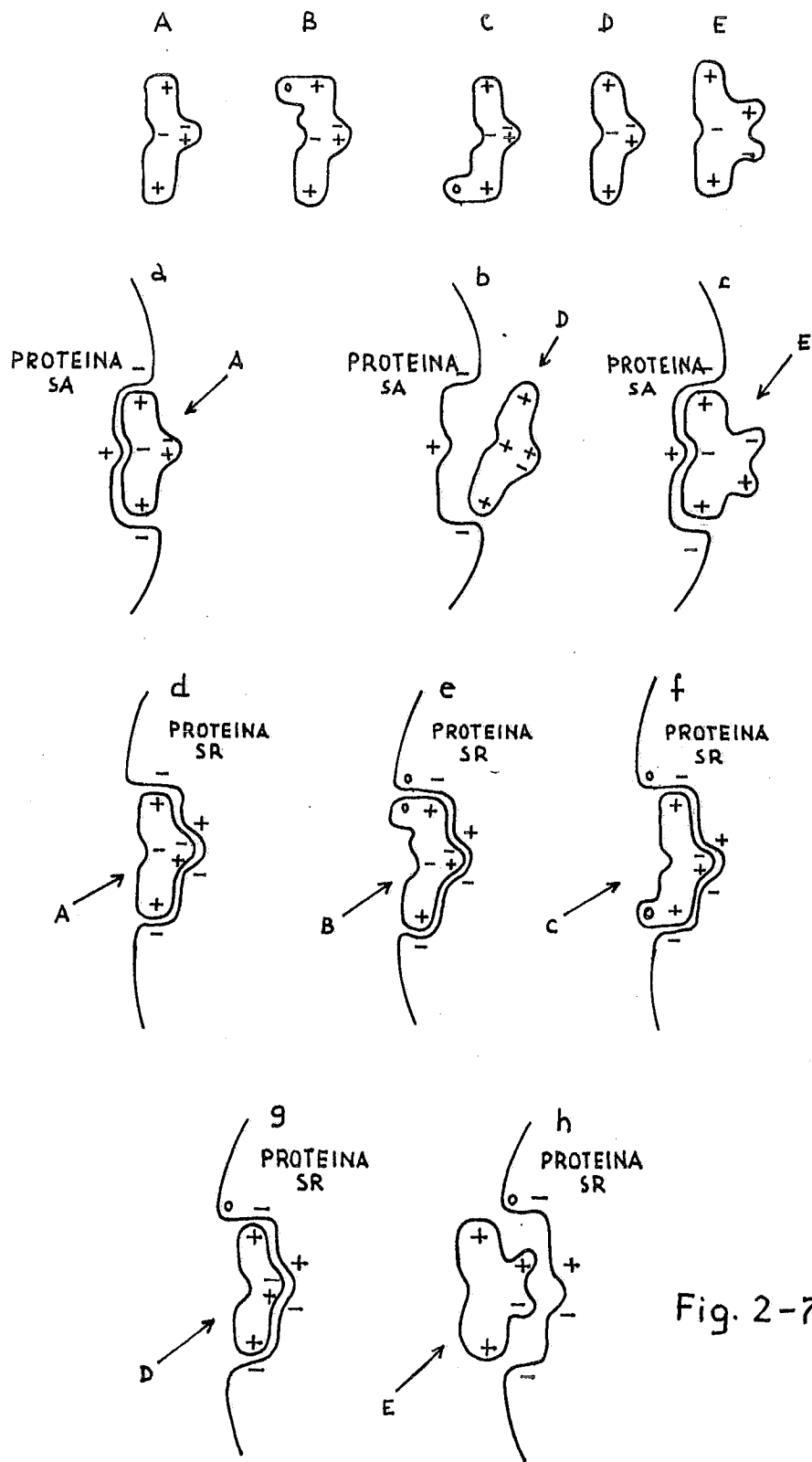


Fig. 2-7

CAPITOLO 3

Regolazione della spontaneità della reazione di associazione tra proteina e legante.

La spontaneità della reazione di associazione tra una proteina ed il legante, cioè la loro affinità, è regolata mediante cambiamenti di conformazione della struttura terziaria e/o quaternaria della proteina, quando nelle due diverse conformazioni la proteina ha valori diversi di affinità verso lo stesso legante.

Queste proteine vengono definite regolate o allosteriche. Se la proteina ha una attività biologica oltre quella di associare il legante (es. enzimi), sono anche dette regolatrici, perchè la loro regolazione regola altre attività cellulari (un enzima "regolato" è anche regolatore di una via metabolica).

Il grado di affinità della proteina verso il proprio legante è misurato dal valore della K di affinità; questo valore è in relazione al valore del ΔG° della reazione di associazione e questo in relazione al numero di legami secondari che si formano tra proteine e legante. Quindi un cambiamento conformazionale della proteina che porti ad una variazione nelle posizioni relative dei residui aminoacidici responsabili delle interazioni con il legante, (cioè nella geometria del sito di legame), può fare aumentare o ridurre il numero e/o la forza dei legami deboli che si formano tra proteina e legante, e ciò fa variare il ΔG° di associazione, e quindi anche il valore della K di affinità, cioè il grado di spontaneità della reazione di associazione tra proteina e legante.

La modulazione dell'attività in senso negativo è al suo massimo quando il complesso non può realizzarsi perchè tra proteina e legante non si forma un numero di legami deboli sufficiente a dare stabilità al complesso, per cui proteina e legante si trovano esclusivamente nella forma libera. In questo caso, anche se il legante incontra la proteina proprio nel sito di legame, il complesso non ha vita perchè si dissocia immediatamente. Il massimo di affinità tra proteina ed il proprio legante è raggiunto quando la proteina è nella conformazione alla quale corrisponde un sito di legame capace di formare con il legante il massimo numero di legami deboli dotati della loro massima forza. Il cambiamento di conformazione di una proteina può favorire la stabilità del complesso incrementando la forza dei legami tra proteina e legante senza necessariamente aumentarne il numero.

Un esempio è l'associazione delle subunità α dell'Hb con l'ossigeno molecolare, dove l'interazione tra proteina e legante avviene sempre tramite un singolo legame di coordinazione, tuttavia in relazione alla conformazione quaternaria dell'Hb le subunità di α hanno valori diversi di

spontaneità di associazione, cioè di affinità per l'O₂. La subunità di un oligomero, pur mantenendo la stessa struttura terziaria e quindi la stessa struttura del sito di legame, ha valori diversi di affinità per il legante se associando il legante è indotta a cambiare conformazione. Infatti in relazione alla conformazione quaternaria, la subunità può essere impedita o libera di cambiare conformazione: se libera la subunità ha alta affinità per il legante, se impedita la subunità ha nulla o scarsa affinità per il legante perchè i legami deboli con le altre subunità dell'oligomero (quaternari) si oppongono alla formazione dei legami deboli con il legante. Anche impedimenti sterici (contatti tra atomi) possono contribuire ad impedire il cambiamento di conformazione delle subunità. Quindi pur mantenendo la stessa geometria e la stessa reattività degli atomi, nel sito di legame la subunità ha valori diversi di affinità verso il legante in relazione alla struttura quaternaria dell'oligomero a cui appartiene. In questo caso l'affinità della subunità è regolata dallo stato della struttura quaternaria dell'oligomero.

Quanto detto spiega la modulazione della spontaneità nell'associazione tra proteina e legante per variazione della costante cinetica di dissociazione (k_2) del complesso, mentre la costante cinetica di associazione (k_1) si assume che rimanga costante. Infatti, la subunità cambia conformazione dopo aver associato il legante, quindi la k_1 rimane la stessa perchè nulla cambia nel sito di legame con il cambiamento di struttura quaternaria. Cambiamenti nella geometria dei residui aminoacidici del sito di legame possono essere responsabili di variazioni della costante cinetica di associazione (k_1) senza necessariamente influire sulla costante cinetica di dissociazione (k_2). Questi casi si osservano quando un residuo aminoacidico con il suo ingombro sterico impedisce l'interazione del legante con la proteina nel sito di legame. Il cambiamento conformazionale della proteina determina uno spostamento di tale residuo, permettendo l'interazione tra legante e proteina. Il valore della costante cinetica di associazione può variare da valori molto piccoli fino a zero, in relazione al fatto che il residuo renda più o meno difficile od impedisca del tutto l'associazione tra legante e proteina. Il cambiamento conformazionale della proteina risulta quindi in un incremento nel valore della costante di associazione (k_1) senza che necessariamente sia variata la k_2 . Si assume che nell'emoglobina T (deossi), le catene α abbiano scarsa affinità per l'O₂ a causa dei valori relativamente alti della k_2 e le catene β a causa dei bassi valori della k_1 e della k_2 (vedere cap.6).

Si assume che in alcune proteine i cambiamenti di conformazione possano portare simultaneamente a variazioni della k_1 e della k_2 .

Le proteine allosteriche sono macchine molecolari le cui parti rigide sono costituite da atomi tenuti insieme da legami covalenti che determinano definite posizioni spaziali degli atomi in legame.

Tuttavia, parti della molecola possono spostarsi l'una rispetto all'altra, perchè atomi e gruppi atomici possano

ruotare attorno a legami covalenti singoli, se ciò non è impedito da altri gruppi atomici per stericità o per formazione di legami deboli. Esiste una grande potenzialità di spostamento in tutte le direzioni dello spazio perchè le proteine sono costituite da sequenze di aminoacidi ed i gruppi che si spostano l'uno rispetto all'altro possono appartenere ad aminoacidi distanti nella sequenza. Come nei congegni meccanici, anche nelle macchine molecolari i movimenti sono limitati dalla presenza di altre parti della macchina (stericità), e come nei congegni elettromagnetici, i movimenti sono impediti dall'attrazione di gruppi atomici tra loro (legami deboli).

La spontaneità dell'associazione tra la proteina ed il suo legante, e quindi la quantità di complesso proteina-legante che si forma all'equilibrio, può essere variata facendo variare la costante di associazione k_1 o la costante di dissociazione k_2 . Tuttavia si assume che i due tipi di controllo possano avere funzioni diverse.

Il controllo della k_1 è un controllo sulla formazione del complesso, non agisce quindi sulla reversibilità della reazione di associazione che è controllata dalla k_2 . Per cui se una proteina, regolata sulla k_1 , ha una k_2 piccola e costante in tutte le conformazioni che la proteina può assumere, la variazione della k_1 fa variare il punto di equilibrio della reazione di associazione, rendendo la formazione del complesso proteina-legante più o meno veloce. Cioè controllando la k_1 si controlla la quantità di complesso ed attraverso essa la velocità di dissociazione del complesso stesso anche se la k_2 rimane costante. Se la k_2 è molto piccola, il complesso risulta indissociabile per tempi molto lunghi e la variazione della k_1 ha le caratteristiche di una attivazione e non di regolazione che per definizione deve essere reversibile. Regolando la k_1 su valori molto piccoli per alcune subunità di uno stesso oligomero (es. subunità della Hb, cap.6) ed avendo valori di k_1 per altre subunità più alti, si stabilisce quali subunità associno per prime il legante. Nel caso di controllo della k_1 di una proteina che ha una k_2 con valore costante ed alto (tuttavia $k_1 \geq k_2$ altrimenti il complesso è inesistente vedere cap.2), il complesso si forma e si dissocia rapidamente quando il valore di k_1 è alto, ma la quantità di complesso che si forma è relativamente poca. L'alta reversibilità di associazione tra P ed L si oppone ad un'alta affinità. Inoltre la regolazione che porta ad una riduzione del valore della k_1 , porta ad una riduzione nella velocità di formazione del complesso proteina-legante, la qual cosa può essere non sempre conveniente per la fisiologia cellulare che può chiedere piccole quantità di complesso formate velocemente. Tenendo presente che l'entità della funzione biologica è determinata dalla quantità del complesso P-L, risulta che il controllo della k_2 (con k_1 costante ed alta in qualsiasi conformazione della proteina), appare la forma più efficiente per il controllo rapido della quantità del complesso PL. Il complesso si forma sempre velocemente, mentre è regolata la sua velocità di dissociazione, per cui la quantità di complesso necessaria

alla cellula è sempre rapidamente raggiungibile sia quando la k_2 viene diminuita, sia quando la k_2 viene aumentata. Inoltre, agendo sulla k_2 si può favorire la dissociazione di complessi molto stabili ($K_{eq} \geq 10^{16}$), mentre facendo diminuire la k_1 ciò non è realizzabile o è un processo lento quando la k_2 ha un valore piccolo. La k_2 può essere aumentata, anche quando la proteina è associata al legante, inducendo (con effettori o reazioni covalenti) cambiamenti conformazionali della proteina, che causino indebolimento e/o una riduzione del numero dei legami deboli tra proteina e legante.

Riassumendo le varie ipotesi sulla variazione dell'affinità verso il legante di una proteina in conseguenza di cambiamenti conformazionali:

1) variando la costante cinetica di associazione (k_1) in una proteina che ha una costante cinetica di dissociazione (k_2) relativamente piccola. Si ha una lenta reversibilità e la regolazione ha le caratteristiche di una attivazione perché il complesso PL viene formato quando occorre ed è stabile per tempi lunghi.

2) variando la k_1 di una proteina che ha la k_2 costante ed alta. Si ha una regolazione reversibile, tuttavia in relazione alla differenza tra i valori di k_1 o k_2 , si possono raggiungere concentrazioni di complesso relativamente piccole e di breve durata (è il caso di alcuni complessi enzima substrato)

3) variando la k_2 con k_1 costante ed alta. Si ha una regolazione reversibile ed un controllo di una larga gamma di concentrazioni del complesso PL. Questo è il tipo di regolazione osservato più frequentemente in natura.

4) variando la k_2 con k_1 costante e relativamente bassa. La regolazione è possibile solo quando si è formata una certa quantità di PL perché la formazione di PL è lenta. E' il caso di complessi proteina-proteina che vengono accumulati, e quando devono essere dissociati, viene variata la k_2 mediante modificazione covalente (ad es. proteolisi) di una delle due proteine.

Quando una proteina o una struttura sopramolecolare devono associarsi ad un'altra molecola o struttura per tempi lunghi, è necessario un alto valore di affinità. I cromosomi si legano alle fibre del fuso con affinità molto alta, per cui si assume che la costante cinetica di dissociazione sia molto piccola e molto più piccola della costante cinetica di associazione. Ciò permette che nella mitosi (o nella meiosi), i cromosomi siano ripartiti opportunamente nelle due cellule (o gameti) che si formeranno. Se un singolo cromosoma si dissocia dal fuso, può accadere che rimanga nella cellula che ha già il suo omologo, causando alterazioni nel corredo cromosomico (rispettivamente mancanza ed eccesso di un cromosoma) nelle due cellule figlie. In genere, un corredo cromosomico alterato risulta in gravi alterazioni delle funzioni cellulari.

Ciò è evitato dotando ogni singolo cromosoma di un'alta affinità verso le fibre del fuso. E' stato calcolato che la K di affinità sia di 10^{16} M^{-1} che corrisponde ad un $\Delta G^\circ = -23 \text{ kcal/mole}$. Alti valori di affinità rende possibile l'associazione nella cellula di reagenti presenti in poche copie (es. cromosoma-proteine del fuso, vedere cap.2).

I complessi con altissima affinità non si possono dissociare in tempi brevi anche se la concentrazione delle due molecole che formano il complesso è zero, per cui per dissociare il complesso viene percorsa un'altra via, cioè una (o più) reazioni diverse invece della reazione inversa a quella di associazione.

Nel caso dei cromosomi la dissociazione dalle fibre del fuso avviene per depolimerizzazione delle stesse fibre del fuso che sono costituite da molte molecole di tubulina (circa 10^8 molecole/fuso). In altri casi la dissociazione può essere provocata con un altro meccanismo. Ad es. i due filamenti di DNA in doppia elica hanno alta affinità tra loro, ed è improbabile che si dissocino spontaneamente; per ottenere la loro dissociazione occorrono enzimi (elicasi) capaci di utilizzare l'energia dei legami anidrici dell'ATP per poter promuovere la dissociazione dei due filamenti di DNA. Per complessi proteina legante dissociabili nelle condizioni cellulari, il meccanismo più semplice e più comune per provocare la dissociazione del complesso proteina-legante è realizzato mediante un cambiamento conformazionale della proteina che risulta in un incremento della costante cinetica di dissociazione. Il cambiamento di conformazione della proteina è in genere operato da leganti effettori che interagiscono con la proteina su siti specifici diversi da quello del legante stesso. L'effettore legandosi alla proteina la induce a cambiare conformazione e, nella nuova conformazione, la proteina forma con il legante un numero inferiore di legami deboli e/o dotati di minore forza, ha cioè una ridotta affinità per il legante essendo il complesso PL meno stabile.

Meccanismi molecolari che inducono cambiamenti di conformazione delle proteine regolate.

Al fine di rendere più semplice la descrizione dei meccanismi che inducono i cambiamenti conformazionali delle proteine regolate, inizialmente verranno prese in considerazione proteine monomeriche, anche se questi meccanismi, che sono presenti sia in proteine monomeriche che in quelle oligomeriche, sono stati studiati in maniera molto dettagliata in proteine oligomeriche delle quali poi è stata anche analizzata a livello molecolare la funzione e la regolazione. Successivamente verrà descritto un altro meccanismo dei cambiamenti di conformazione delle proteine, "l'effetto cooperativo", che è possibile solo su proteine oligomeriche.

Una proteina regolata ha la capacità di assumere almeno due conformazioni alle quali corrispondono affinità diverse verso il proprio legante. Le due conformazioni hanno stabilità diversa, ed il livello di energia libera delle due conformazioni differisce per poche kcal/mole a 37°C (tab.2-3), per cui la proteina oscilla continuamente tra le due forme a causa dell'agitazione termica delle molecole. Proteine non regolate hanno una struttura tridimensionale

stabile che può essere modificata da urti casuali con altre molecole o da molecole che si leghino casualmente ad esse. In questa conformazione assunta accidentalmente, l'attività biologica della proteina può essere aumentata o diminuita; tuttavia le proteine tendono a riassumere di nuovo la struttura originale naturale perchè è la più stabile delle possibili per quella data proteina.

In una proteina regolata, se una conformazione risulta più stabile rispetto all'altra di circa $-4,26$ kcal/mole, la proteina si troverà quasi esclusivamente in quella forma: per ogni 100.000 molecole nella conformazione più stabile se ne troveranno solo 100 nella conformazione meno stabile (tab. 2-3). L'equilibrio tra queste due conformazioni è dinamico e la conversione di una forma nell'altra avviene con alta frequenza perchè l'energia libera dei legami che stabilizzano la conformazione più stabile è insufficiente ad opporsi all'energia termica.

Nel cambiamento di conformazione (cambiamento di struttura terziaria) si ha la rottura di alcuni legami deboli e per alcune proteine anche la formazione di nuovi legami deboli. Quindi in genere le due conformazioni differiscono per un numero di legami secondari che è molto piccolo (vedere tab. 2-3). Le due conformazioni possono avere anche la stessa stabilità ed i totali delle energie dei rispettivi legami intramolecolari risultano uguali. In questo caso la metà delle molecole della proteina si troveranno in una conformazione e l'altra metà nell'altra. In genere le proteine regolate hanno conformazioni che differiscono per poche kcal/mole per ogni monomero.

In una proteina regolata, ad una delle due conformazioni corrisponde un sito di legame che ha per il legante un'alta affinità, mentre nell'altra conformazione lo stesso sito ha scarsa o nessuna affinità per il legante.

Se nella conformazione più stabile la proteina ha il sito di legame con alta affinità per il legante, la quasi totalità delle molecole della proteina poste in presenza del legante, saranno capaci di associarlo con alta affinità; si assume quindi che la proteina sia naturalmente nella conformazione biologicamente attiva.

Se nella conformazione più stabile la proteina ha il sito di legame con scarsa o nessuna affinità per il legante, la quasi totalità delle molecole di proteina poste in presenza del legante saranno incapaci di legarlo, quindi la proteina è naturalmente nella conformazione biologicamente inattiva o meno attiva. Tuttavia, una proteina biologicamente inattiva nella sua conformazione più stabile può essere spinta ad assumere la conformazione meno stabile e quindi a divenire biologicamente attiva. Egualmente una proteina biologicamente attiva nella sua conformazione più stabile può essere spinta ad assumere la conformazione meno stabile ed a perdere o ridurre la sua attività biologica.

Anche se la proteina esiste in due sole conformazioni stabili, per cui le molecole proteiche possono esistere nella conformazione biologicamente attiva od in quella inattiva, l'attività biologica può essere controllata finemente perchè i meccanismi di regolazione agiscono modificando il numero delle molecole proteiche in una o nell'altra conformazione. Quindi il controllo dell'attività

biologica non è per modulazione dell'attività biologica della singola molecola che può essere solo attiva o inattiva (o meno attiva), cioè senza valori intermedi di attività, ma per modulazione delle quantità relative delle molecole nella conformazione attiva ed in quella inattiva.

I meccanismi molecolari tramite i quali si realizzano i cambiamenti di conformazione di una proteina regolata sono due:

1) l'interazione della proteina con un secondo legante (figg. 3-1 e 3-2, 3-4)

2) o una reazione covalente catalizzata da un enzima che lega una piccola molecola alla proteina (fig. 3-5).

Le proteine che cambiano conformazione e quindi attività biologica in risposta a questi meccanismi molecolari sono dette regolate.

Nel meccanismo del primo tipo, la proteina ha la capacità di legare un altro legante di specie molecolare diversa dal primo. Questo legante è detto effettore di regolazione e si lega alla proteina in un sito specifico, geneticamente determinato, detto sito di regolazione. Geneticamente determinato significa che nella sequenza dei nucleotidi del gene che codifica la proteina, è programmata la sequenza aminoacidica che, per autoassemblaggio, darà la forma tridimensionale (globulare) della proteina, sulla cui superficie si formeranno sia il sito di legame per il legante-substrato, cioè del legante sul quale la proteina esercita la sua attività biologica (trasporto, catalisi ecc.), sia il sito di legame per il legante-effettore di regolazione. E' importante definire come "geneticamente determinato" il sito di un effettore di regolazione, perchè composti di sintesi non biologiche (es. farmaci) possono legarsi sulla superficie di proteine inducendole ad assumere una particolare conformazione, modificandone l'azione biologica; sebbene il composto sintetico si leghi con alta affinità e specificità alla superficie della proteina, il suo sito di legame non è stato geneticamente determinato per quello scopo e l'associazione è casuale e non ha finalità di regolazione fisiologica.

Il legante-effettore di regolazione può interagire con la proteina in due modi. Può interagire con alta affinità con la proteina solo quando è nella conformazione meno stabile, e l'associazione del legante effettore con la proteina conferisce maggiore stabilità alla conformazione (figg. 3-1a, 3-2a, 3-4a e c), oppure l'effettore si lega alla proteina nella conformazione più stabile e la destabilizza, per cui la proteina è indotta a cambiare conformazione ed assumerne un'altra che è più stabile della prima per la presenza dell'effettore legato alla proteina stessa (vedere figg. 3-1b, 3-2b, 3-4b e d).

Indipendentemente da come agisce, l'effettore sposta l'equilibrio esistente tra le due conformazioni della proteina. Se nella conformazione imposta dall'effettore la proteina è attiva, l'effettore è detto positivo o attivatore (figg. 3-1a e b e 3-4a e b), se invece la proteina è inattiva o meno attiva, l'effettore è detto negativo o inibitore (fig. 3-2a e b). Le proteine regolate con questo meccanismo sono dette allosteriche o regolate da effettore. L'azione dell'effettore è reversibile. Rimosso dalla

soluzione l'effettore, la proteina riassume spontaneamente la conformazione originale perchè è la più stabile in assenza dell'effettore. Persi i legami che formava con l'effettore, la proteina riacquista stabilità formandone altri intramolecolari.

Il termine "allosterico" (forma diversa) introdotto da Monod, Changeux e Jacob nel 1963, fu riferito inizialmente ad un composto (effettore allosterico) che legandosi ad una proteina in un sito specifico (sito allosterico) ne favorisce il cambiamento di conformazione (transizione allosterica) che modifica anche il sito attivo che diviene più o meno affine al substrato.

Nella prima formulazione dell'allosterismo, si era presa in considerazione solo la molecola diversa da quella del legante sul quale la proteina esercita la sua attività biologica (trasporto, catalisi ecc.), al fine che fosse chiaro che l'interazione osservata tra legante ed effettore non risultasse dal fatto che ambedue si legavano su uno stesso sito della proteina, come ad esempio nell'inibizione competitiva pura, dove substrato ed inibitore interagiscono ambedue nel sito catalitico.

Successivamente (1965) Monod, Whyman e Changeux hanno esteso il termine allosterico anche per interazioni che avvengono tra leganti identici che si legano su siti diversi di una stessa proteina, definendole "effetto omotropico", e quelle che avvengono tra leganti diversi "effetto eterotropico".

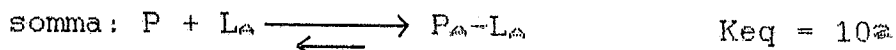
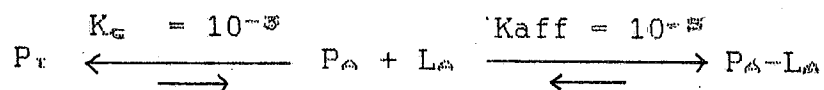
In definitiva la proteina allosterica ha queste caratteristiche: ha almeno due conformazioni stabili convertibili l'una nell'altra reversibilmente (transizione allosterica) ad opera dell'agitazione termica, due siti specifici di legame a cui associa due leganti di specie chimica diversa di cui uno (effettore) induce e/o stabilizza una conformazione della proteina.

In questo contesto, come suggerito da Monod, Changeux e Jacob (1963), il sito di legame tramite il quale la proteina svolge la sua attività biologica, è detta "sito attivo", ed il legante su cui la proteina esercita la sua attività biologica "substrato". Nell'uso comune, per le proteine di trasporto il sito attivo è indicato come sito di legame più il nome del legante (es. sito di legame dell'O₂ nella Mb e Hb); negli enzimi il sito attivo è il sito catalitico. Per tutte le proteine, l'altro sito è detto sito di regolazione (o sito allosterico) perchè ad esso si lega il legante effettore (effettore allosterico) che modula l'attività biologica della proteina stabilizzando una delle due conformazioni della proteina.

Quando si dice che la proteina è nella conformazione attiva (o inattiva) ci si riferisce alla conformazione in cui il sito attivo è capace ad associare il legante substrato ed a svolgere la sua azione biologica (trasporto, catalisi ecc.). I meccanismi di regolazione illustrati nelle figg. 3-1, 3-2 e 3-4) sono velocemente reversibili data la relativamente bassa stabilità (-2,8 kcal/mole) dei complessi proteina-legante-effettore. La labilità dei complessi nelle condizioni cellulari è necessaria per avere una efficiente regolazione. Variando la concentrazione dell'effettore si fa variare la quantità relativa delle molecole di proteina nelle due conformazioni (attiva ed inattiva) e quindi si fa

variare l'attività biologica della proteina stessa che in questo modo può essere regolata finemente molecola per molecola.

L'incremento di affinità verso il proprio substrato che una proteina monomerica può avere con il cambiamento di conformazione, è causato da una modificazione della struttura del sito di legame del substrato (maggiore complementarità di carica e di forma) (schematizzato nelle figure 3-1, 3-2, 3-4). Si può avere incremento di affinità senza cambiamento di conformazione terziaria, vedere (Cap. 6). Il meccanismo tramite il quale l'effettore riesce a convertire un numero grande di molecole di proteina dalla conformazione inattiva a quella attiva è molto semplice. Consideriamo l'esempio di fig. 3-1a, sappiamo che poche molecole di P saranno nella conformazione capace di legare l'effettore positivo (L_A), solo 1 su 1000, quindi qualsiasi sia la quantità di molecole di L_A aggiunta alla soluzione, poche di esse potranno associarsi alla proteina. Tuttavia, i complessi P_A-L_A che si sono formati riducono la concentrazione originale delle molecole P_A libere che sono riformate dalle molecole di P_I al fine di ristabilire l'equilibrio di conformazione che è di 1000 P_I per ogni P_A . Così se ci sono ancora molecole di L_A libere si legheranno alle P_A neoformate e così via. Lo stesso meccanismo opera se si fanno aggiunte successive di L_A oppure si aggiungono in una sola volta quantità di L_A capaci di saturare P, per cui quasi tutte le molecole della proteina P si troveranno nella conformazione P_A . Le modalità di aggiunta, come quelle di sottrazione dalla soluzione del L_A non hanno significato, quello che conta è la concentrazione di L_A nella soluzione perchè la reazione di associazione è veloce e velocemente reversibile. La quantità di complessi P_A-L_A che si formano è in relazione alla concentrazione di P totale, alla costante di conformazione (nell'esempio $K_C = 10^{-3}$ litri/mole) alla costante di affinità di P_A verso il legante-substrato (LS) (nell'esempio 10^{-4} litri/mole).



Questo meccanismo di conversione di P_I in P_A è veloce e velocemente reversibile perchè dipende dalla reazione di associazione tra P_A ed L_A e dalla reazione di dissociazione del complesso P_A-L_A che coinvolgono la formazione e la rottura di pochi legami deboli che sono continuamente spezzati dall'agitazione molecolare. Quindi il meccanismo risponde velocemente alle variazioni di concentrazione di L_A , sia che essa aumenti sia che essa decresca, causando parallelamente aumenti o decrementi di P_A nella forma di complesso P_A-L_A .

Velocità di azione e veloce reversibilità sono caratteristiche essenziali dei meccanismi di regolazione. Il modello esposto in fig. 3-1a mostra che ogni molecola di P esiste in due conformazioni, una biologicamente attiva, capace cioè di legare il substrato, ed una biologicamente

inattiva. Quindi la graduazione delle quantità dell'attività biologica della proteina avviene sulla base del numero delle molecole della proteina stessa nella conformazione P_A che dipende dalla concentrazione di L_A nella soluzione in cui è presente la proteina. Inoltre il modello in fig. 3-1a mostra che anche in assenza di L_A esiste sempre una certa quantità di proteina nella conformazione attiva (nell'esempio 1 molecola di P_A per ogni 1000 di P_I). Ciò dipende dalla natura dell'equilibrio di conformazione e porta come conseguenza che una certa quantità di proteina sia sempre attiva anche in assenza di attivatore.

Questa caratteristica, l'incompleta inibizione delle attività biologiche di proteine regolate da effettore, ed in particolare degli enzimi, si ritiene responsabile del continuo ricambio (turnover) di tutti i componenti cellulari, piccole molecole o macromolecole.

La possibilità di formare complessi proteina- L_S in assenza di L_A (attivatore) (figg. 3-1a, 3-4a) risulta in una curva di saturazione da L_S che indica una scarsa affinità delle proteina verso L_S (curva 1, fig. 3-3a).

In fig. 3-3b sono rappresentate le curve di saturazione della proteina di fig. 3-1b. Questa proteina, in assenza di L_A (attivatore), è tutta nella conformazione inattiva, che è completamente incapace a legare L_S , così anche in presenza di alta $[L_S]$ non si formano complessi P_A-L_S come indicato dalla curva 1.

Osservando le figg. 3-1a e 3-4a si possono fare per il substrato le stesse considerazioni che sono state fatte per l'effettore delle stesse figure. Anche il substrato L_S forma legami deboli con la proteina nel suo sito di legame e quindi stabilizza la forma attiva della proteina.

Incrementando la concentrazione di L_S si converte P_I in P_A anche in assenza dell'effettore L_A e la proteina può essere saturata di L_S anche in assenza di attivatore. Tuttavia la presenza dell'effettore fa aumentare il numero di molecole di proteina nella conformazione attiva ed a parità di concentrazione di substrato e di proteina si formano più complessi proteina-substrato (vedere figg. 3-3a).

Il meccanismo di regolazione è anche velocemente reversibile perchè l'associazione di L_S e L_A alla proteina nella forma P_A sono indipendenti, per cui se la $[L_A]$ si abbassa, L_A si dissocia sia dai complessi P_A-L_A che da quelli $P_A-L_A-L_S$ portando alla formazione di P_A libera e di complessi P_A-L_S : tutto ciò porterà ad una riduzione di complessi P_A-L_S e $P_A-L_A-L_S$. Infatti la proteina nella conformazione P_A libera ritornerà spontaneamente nella conformazione P_I perchè più stabile, ed i complessi P_A-L_S resi meno stabili per la perdita di L_A tenderanno a dissociarsi. Quindi l'abbassarsi della concentrazione di L_A porta da uno spostamento di tutti questi equilibri verso P_I (vedere fig. 3-4a). Per le proteine della fig. 3-1b si ammette che il passaggio dalla conformazione inattiva a quella attiva, sia possibile solo se indotto da L_A . In assenza di L_A il substrato non può associarsi alla proteina.

Da ciò risulta che l'incremento di L_S non fa variare il numero di molecole di proteina nella conformazione attiva e (a differenza della proteina in 3-1a) non si raggiungono i valori vicini al 100% di saturazione (curva 1 e 2 della

fig. 3-3b) salvo che la proteina sia saturata anche da L_A (curva 3).

Il meccanismo di regolazione delle proteine regolate che, in assenza di effettore si trovano prevalentemente (figg. 3-2a, 3-3c, 3-4c) od esclusivamente (figg. 3-2b, 3-3d, 3-4d) nella conformazione attiva e sono regolate da un inibitore (L_I), è concettualmente identico a quello descritto sopra per le proteine, prevalentemente od esclusivamente nella conformazione inattiva, regolate da un effettore positivo. Una differenza è che questo tipo di proteina, L_S ed L_I , stabilizzano conformazioni diverse, L_S quella attiva ed L_I quella inattiva, per cui incrementando la (L_S) si riesce sempre a saturare la proteina.

In tutti i modelli proposti (figg. 3-1+3-4), la presenza dell'effettore positivo e negativo regola la quantità relativa delle due conformazioni in cui esiste la proteina, ed in questo modo la spontaneità di associazione tra P ed L_S . Questo è l'aspetto fondamentale della regolazione allosterica, cioè di poter far variare la spontaneità di una reazione in un senso o nell'altro. Lo stato di equilibrio della reazione di associazione tra proteina e substrato può essere modificato senza far variare la concentrazione dei due reagenti (P ed L_S) variando la concentrazione dell'effettore (L_A o L_I), composto che non ha nessuna relazione chimica con il substrato e non interagisce direttamente con lui. In realtà, abbiamo visto che viene cambiata la costante di equilibrio della reazione di associazione tra la proteina ed il suo substrato senza cambiare la temperatura.

Questa è stata una importante scoperta della biologia molecolare che ha introdotto nuovi concetti in chimica, e cioè che il valore della K_{eq} può essere modificato senza variare la temperatura, e si può cambiare l'equilibrio della reazione di associazione senza cambiare la la concentrazione dei reagenti e/o quella del prodotto di reazione. Questa proprietà è ristretta ai casi in cui uno dei reagenti è una macromolecola che può esistere in due conformazioni con le proprietà sopra descritte. Il fatto che un legante effettore sia attivatore (fig. 3-1) o inibitore (fig. 3-2) di una proteina, non è nelle proprietà chimico-fisiche della sua molecola che gli conferiscono solo la proprietà di legarsi alla proteina, ma nel fatto che la proteina sia indotta e/o stabilizzata nella conformazione attiva o inattiva. Nelle cellule esistono metaboliti che sono attivatori di una proteina ed inibitori di un'altra. Tuttavia i due tipi di meccanismo svolgono ruoli di regolazione diversi: nel primo caso (fig. 3-1) la proteina è prevalentemente inattiva e quando occorre viene attivata da incrementi di [effettore] come nell'attivazione in avanti (forward activation) in cui i metaboliti stimolano la loro utilizzazione; nel secondo caso (fig. 3-2) la proteina è utile al metabolismo cellulare prevalentemente nella conformazione attiva e viene inibita, se troppo attiva, da incrementi di [effettore] come nei meccanismi di inibizione retrograda (feed-back inhibition), cioè l'accumularsi di un prodotto inibisce la sua sintesi. Queste sono le possibilità di regolazione e la natura le seleziona in relazione alle necessità metaboliche della cellula.

Cambiamento di conformazione della proteina mediante modificazioni covalenti reversibili.

L'altro meccanismo tramite il quale le proteine sono indotte a cambiare conformazione, avviene mediante la legatura covalente di una piccola molecola alla proteina (figg. 3-5 e 3-6). In genere viene legata covalentemente (legame estereo) ad un residuo specifico (posto in un determinato punto della sequenza e quindi della struttura della proteina) di serina o treonina o tirosina della proteina, un gruppo fosfato ceduto da una molecola di ATP con una reazione catalizzata da un enzima (proteina cinasi specifica). L'attività di molte proteina-cinasi è sotto controllo ormonale.

La scissione idrolitica del legame aldeidico-fosforico (ad alta energia) dell'ATP rende energeticamente possibile la reazione e si assume che il gruppo fosfato carico negativamente, destabilizzi la conformazione in cui si trova la proteina e la induca ad assumerne un'altra. Ciò può avvenire perchè la carica negativa del gruppo fosforico respinge i residui aminoacidici della proteina, carichi anch'essi negativamente e/o perchè vengono attratti residui aminoacidici della proteina carichi positivamente e/o perchè il gruppo di acido fosforico interagisce stericamente con gruppi non carichi della proteina. Tutte queste azioni creano tensione nella molecola proteica e la tensione viene rimossa con un cambiamento di conformazione.

La fosforilazione porta inizialmente la proteina ad uno stato di transizione con un livello energetico più alto. Poi, con il cambiamento di conformazione, viene liberata parte dell'energia assunta con la fosforilazione. La rimanente parte di energia è stata assunta dalla proteina ed utilizzata per rompere i legami che stabilizzavano la conformazione originale della proteina. La nuova conformazione è molto stabile perchè la proteina può cambiare conformazione solo se viene rimosso il gruppo fosfato, e ciò non può avvenire per azione dell'agitazione molecolare perchè il gruppo fosfato è legato covalentemente alla proteina.

Tuttavia, il meccanismo di induzione mediante fosforilazione di una nuova conformazione di una proteina, è reversibile ad opera di enzima proteina-fosfatasi specifica, che scinde idroliticamente il legame estereo del fosfato con i residui di serina. La proteina defosforilata torna nella conformazione originale liberando l'energia di idrolisi del legame estereo del fosfato e quello di formazione dei legami deboli intramolecolari che erano stati spezzati con il cambiamento di conformazione indotto dalla fosforilazione. La rimozione dell'attivazione operata per defosforilazione è possibile anche se la proteina è tutta sotto forma di complesso proteina-fosforilata-substrato.

Questi complessi, per la presenza dei legami deboli che si sono formati tra proteina e legante, hanno stabilità superiore a quella della proteina non fosforilata (fig. 3-5c). Tuttavia i complessi si formano e si dissociano a velocità molto alte, mentre la defosforilazione è stabile nel tempo, per cui una volta che le proteine complessate con il substrato sono defosforilate, rimarranno nella

conformazione attiva finchè legate al substrato, ma appena il substrato si dissocierà dalla proteina, non potrà riassociarsi perchè la proteina avrà assunto la conformazione inattiva. Così senza che [P] e/o [Ls] diminuiscano, la defosforilazione causerà un decremento nel numero di complessi P-Ls che può essere arrestato solo bloccando la defosforilazione. Mentre un incremento di complessi P-Ls è ottenuto solo per attivazione della fosforilazione.

Sebbene le differenze energetiche tra le due conformazioni delle proteine controllate per mezzo di reazioni covalenti (fig. 3-5), e tra le due conformazioni delle proteine controllate da effettori (figg. 3-1 e 3-2) siano dello stesso ordine di grandezza (negli esempi delle figure indicate sono uguali), la stabilità nel tempo delle singole molecole proteiche nelle conformazioni indotte dalla fosforilazione è, in assenza di enzimi, superiore rispetto a quelle indotte da effettori. Infatti l'energia di attivazione richiesta per spezzare un legame covalente è tale da richiedere l'intervento di un enzima, mentre l'associazione tra effettore e proteina è continuamente spezzato dall'agitazione molecolare. Da ciò risulta che il legante substrato può rimuovere l'inibizione causata da effettori negativi, mentre ciò non è verificabile con enzimi attivati mediante fosforilazione (figg. 3-3, 3-6).

In alcune proteine, la conformazione biologicamente più attiva è quella fosforilata, e la defosforilazione causa una inattivazione della proteina che diviene non affine (o poco affine) al substrato. Per altre proteine si ha il contrario, sono poco o non attive nella forma fosforilata e vengono attivate con la defosforilazione. Analogamente a quanto visto per gli effettori allosterici, non è la fosforilazione che "per se" determina l'attivazione o l'inibizione della proteina, ma l'associazione dell'attività biologica ad una o l'altra conformazione della proteina.

Ovviamente, l'associazione tra fosforilazione ed attivazione, o viceversa tra fosforilazione e l'inibizione dell'attività biologica della proteina, non è casuale ma geneticamente determinata, per il ruolo che la proteina svolge nel metabolismo. Gli enzimi o fattori proteici delle vie metaboliche degradative, sono attivati quando vengono fosforilati, mentre gli enzimi o fattori proteici delle vie metaboliche sintetiche, sono resi inattivi con la fosforilazione; ne consegue che la fosforilazione inibisce gli enzimi delle vie degradative ed attiva quelli delle vie sintetiche. Questa coordinazione è richiesta per evitare cicli futili, cioè che vie sintetiche o degradative funzionino simultaneamente degradando composti e liberando calore.

Per semplicità, nelle figg. 3-5 e 3-6 il meccanismo di regolazione per modificazioni covalenti è stato illustrato utilizzando proteine monomeriche. Identici meccanismi operano su proteine oligomeriche. Gli esperimenti indicano che molte proteine regolate mediante fosforilazione sono enzimi oligomerici.

Interazioni cooperative tra proteine olicometiche e leganti.
Un meccanismo per regolare la spontaneità della reazione di
associazione tra proteina e legante.

Nel capitolo precedente abbiamo visto che esistono proteine monomeriche che possono assumere due conformazioni stabili a cui corrispondono valori di affinità diversi verso il legante-substrato e l'equilibrio tra le due forme è influenzato da leganti effettori che interagiscono con la proteina monomerica in un sito diverso da quello del legante-substrato.

Anche le proteine costituite da due o più subunità (proteine oligomeriche) possono essere dotate delle stesse proprietà allosteriche sopra indicate, e le subunità, pur mantendosi associate, possono interagire indipendentemente con i leganti ed i cambiamenti di conformazione a cui va incontro una subunità non sono limitati dal contatto con le altre subunità, nè interferiscono sui cambiamenti di conformazione che le altre subunità possono avere.

Queste proteine oligomeriche si comportano identicamente alle proteine monomeriche ed hanno quindi curva di saturazione da L_0 ad L_∞ iperboliche (vedere fig. 3-9a). Esistono proteine oligomeriche le cui subunità non sono completamente indipendenti le une dalle altre e la conformazione di una subunità influenza le subunità vicine, per cui se una subunità ha associato il legante ed ha assunto una conformazione più affine al legante, stabilizza o induce, o rende più facile l'assunzione della stessa conformazione da parte delle subunità a lei vicine (figg. 3-7+3-9). Si ha così un incremento di affinità verso il legante, rispetto alla affinità che la stessa proteina avrebbe alle stesse concentrazioni di legante, se non fosse dotata delle particolari proprietà di interazione tra subunità. La facilitazione alla associazione della seconda molecola di legante è detta effetto cooperativo e produce una curva di saturazione da legante di tipo sigmoide. La curva indica che la molecola di proteina passa rapidamente da uno stato in cui non ha nessun legante sulla sua molecola a quello in cui tutte le sue subunità hanno associato il legante (fig. 3-7c).

Se consideriamo un numero grande di molecole di proteina e di legante, l'effetto cooperativo è osservabile come un meccanismo che tende a far saturare di legante tutte le subunità di una stessa molecola, piuttosto che distribuire il legante su più molecole di proteina. Quindi gli oligomeri si troveranno prevalentemente nelle forme libere (senza legante) o complessate con il legante su tutte le subunità. il numero di molecole complessate aumenta con l'aumentare della concentrazione del legante non in maniera lineare. A basse concentrazioni di legante L si associerà prevalentemente su una subunità della proteina e per uguali incrementi di $[L]$ si osservano piccoli incrementi di complessi $[PL]$ fino ad un certo valore di $[L]$ (che è in genere molto piccolo). Dopo questo valore per gli stessi incrementi di $[L]$, si hanno incrementi di $[PL]$ maggiori di quelli osservati in precedenza. La curva di saturazione ha un flesso verso l'alto, cioè la proteina ha ora una maggiore affinità verso il legante. Questa maggiore affinità permane

fino alla saturazione della proteina, per cui la curva avrà la parte centrale lineare e poi un altro flesso tendendo al 100% di saturazione (fig. 3-7d).

Anche l'effetto cooperativo è un meccanismo di controllo della spontaneità di una reazione di associazione tra proteina e legante ed è operato dallo stesso legante.

Risulta infatti che l'affinità verso il legante è diversa in relazione alla concentrazione del legante stesso.

L'esistenza dell'effetto cooperativo dipende da alcune proprietà della proteina:

1) la proteina è un oligomero le cui subunità possono esistere in due conformazioni di cui una non affine o meno affine al substrato dell'altra subunità che ha alta affinità per il substrato.

2) le due conformazioni sono convertibili rapidamente e reversibilmente l'una nell'altra per azione dell'agitazione molecolare causata dal calore e/o per azione del legante.

3) l'equilibrio di conformazione è fortemente spostato (a sinistra) verso la conformazione meno affine al legante che è la più stabile per la presenza di legami deboli tra le subunità. Questi legami, detti quaternari, sono spezzati quando le subunità cambiano conformazione.

4) l'effettore associandosi ad una subunità la stabilizza nella conformazione attiva o induce la subunità ad assumere questa conformazione.

5) quando una subunità è stabile nella conformazione attiva stabilizza anche le altre subunità nella stessa conformazione (fig. 3-7a e 3-8, modello della simmetria di conformazione) o rende le altre subunità più affini al legante (fig. 3-7b, 3-8, modello sequenziale).

L'effetto cooperativo risulta da un sistema costituito da "reazioni" che hanno spontaneità in direzione opposta: il cambiamento di conformazione ha spontaneità verso sinistra, mentre la reazione di associazione tra proteina e legante verso destra. La progressiva aggiunta di legante fa spostare l'equilibrio conformazionale verso destra così che la nuova conformazione più affine al legante, viene assunta proprio in conseguenza dell'associazione tra proteina e legante.

Questo meccanismo molecolare è detto effetto cooperativo.

Una proteina oligomerica è dotata di effetto cooperativo se:
-le sue subunità possono assumere almeno due conformazioni dotate di valori diversi di stabilità e di valori diversi di affinità per il legante.

-la costante di conformazione od allosterica (K_c), cioè la costante dell'equilibrio tra le due conformazioni delle proteine:

$$K_c = \frac{[\text{P-conformazione meno stabile}]}{[\text{P-conformazione più stabile}]}$$

è minore di 1.

-l'effettore è più affine alle subunità nella conformazione meno stabile (la induce e/o stabilizza).

In teoria, l'effetto cooperativo potrebbe esistere anche su una proteina monomerica se avesse due siti di legame per lo stesso legante, e dopo averne legato uno cambiasse conformazione ed il secondo sito divenisse più affine al

legante. La natura non sembra aver favorito questo tipo di proteina, forse è biologicamente più semplice realizzare subunità identiche o molto simili, che associandosi formino oligomeri con le proprietà sopra indicate.

Cooperatività negativa.

Esistono proteine oligomeriche che, quando una loro subunità associa una molecola di legante, le altre subunità divengono meno affini allo stesso legante. Questo meccanismo è detto con termine improprio cooperatività negativa o anticooperatività. La cooperatività negativa non può essere spiegata con il modello della simmetria di conformazione perchè in questo modello le subunità sono identiche ed hanno tra loro rapporti spaziali e di legame identici. Quindi se il legante ha più affinità per la forma meno stabile, si ha l'effetto cooperativo positivo (figg. 3-7, 3-8); se il legante ha maggiore affinità per la forma più stabile, non si ha effetto cooperativo positivo e neppure negativo, perchè la quasi totalità della proteina è in quella forma. Il modello sequenziale, che ammette l'esistenza di oligomeri aventi subunità diverse e che possono interagire tra loro in maniera diversa (figg. 3-7, 3-9), può spiegare il meccanismo della cooperatività negativa. Quando una subunità associa il legante e cambia conformazione, rende la (le) subunità vicine meno affini al legante stesso. Ciò può essere spiegato assumendo che il cambiamento di conformazione della prima subunità porti alla formazione di altri legami deboli tra le due subunità, per cui il cambiamento di conformazione della seconda subunità richiede più energia e quindi è meno affine al legante.

Le proteine dotate di cooperatività negativa hanno una curva di saturazione da legante iperbole simile e raggiungono la saturazione a concentrazioni di L molto più alte di quelle richieste per saturare una proteina non dotata di effetto cooperativo o dotata di cooperatività positiva verso il legante (vedere fig. 3-9).

Ipotesi sulla funzione dell'effetto cooperativo.

La funzione dell'effetto cooperativo è valutata sulla variazione di concentrazione di legante necessaria per formare la stessa quantità di complessi proteina legante. Ad esempio, se vengono confrontate le curve di saturazione da legante di una proteina non dotata di effetto cooperativo (iperbole), di una proteina dotata di moderato effetto cooperativo positivo (sigmoide) e di una proteina dotata di effetto cooperativo negativo (iperbole simile), vediamo che per passare dal 10% al 90% di saturazione, occorrono rispettivamente variazioni di concentrazione di legante pari a 81, 9 e 6541 volte (vedere fig. 3-9).

Questa proprietà dell'effetto cooperativo positivo, grandi variazioni della [PL] per piccole variazioni di [L] è definita: a) come amplificazione della risposta (perchè rispetto alle proteine non dotate di questo

effetto, per le stesse variazioni di $[L]$, la P associa (o dissocia) maggiori quantità di L), b) regolazione amplificata o di massima regolazione (perchè l'attività biologica, che è dipendente dalla quantità di legante associato, varia di quantità maggiori), c) regolazione veloce (perchè per variare la $[L]$ occorre tempo, quindi per variare la stessa quantità di attività biologica occorre operare una minore variazione di $[L]$ e per ciò occorre meno tempo). Questa proprietà dell'effetto cooperativo ha ruolo biologici importanti: le proteine deposito e di trasporto possono assumere e rilasciare grandi quantità di L in risposta a variazioni relativamente piccole di concentrazione di legante libero. Egualmente, gli enzimi dotati di cooperatività positiva da substrato hanno una regolazione amplificata rispetto agli enzimi non dotati di tale effetto (vedere cap. 4).

Tuttavia questa non sembra essere l'unica proprietà conferita dall'effetto cooperativo, perchè esistono proteine dotate di un effetto cooperativo non molto forte che hanno curve di saturazione che con un flesso verso l'alto meno concavo di quello della curva riportata in fig. 3-9. La saturazione tra il 10% ed il 90% per queste proteine richiede una variazione di concentrazione di legante che è uguale (e talvolta

superiore) a quella della stessa proteina completamente attiva e che con lo stesso legante dà una curva di saturazione iperbolica (vedere fig. 3-7d). Una ipotesi considera importante il fatto che una proteina dotata di effetto cooperativo, ha la maggiore variazione di saturazione sempre a valori di $[L]$ più alti di quelli di una proteina non dotata di questo stesso effetto.

Indipendentemente dal tipo di curva di saturazione, le maggiori variazioni di $[PL]$ associate al maggior valore di $[PL]$, è per valori di $[L]$ intorno al 50% di saturazione (vedere fig. 3-7). Con saturazioni superiori al 50% si hanno valori di $[PL]$ maggiori, tuttavia la curva tende al plateau e quindi, pur variando molto $[L]$, si hanno piccole variazioni di $[PL]$; per valori inferiori al 50% di saturazione la variabilità della $[PL]$ in funzione della L è circa uguale, ma la $[PL]$ è inferiore al 50% di saturazione. Il significato di avere la regolazione a concentrazioni di $[L]$ più alte, è quello di poter arrivare a dissociare grandi quantità di complessi PL, cioè rilasciare grandi quantità di L senza dover portare la $[L]$ a valori molto bassi.

Quindi la proprietà che l'effetto cooperativo positivo conferisce alla regolazione delle proteine, è ora definita in maniera completa: regolazione amplificata e/o veloce associata a concentrazioni di L libero più alte.

Questa proprietà permette alla HbO_2 di rilasciare grandi quantità di O_2 anche a $[O_2]$ relativamente alte, in modo che l' O_2 possa diffondere dai globuli rossi nel plasma e da questo all'interno delle cellule ed essere in concentrazioni sufficientemente alte a mantenere il metabolismo ossidativo. Una proteina con curva di saturazione iperbolica per trasportare e rilasciare le stesse quantità di O_2 , richiederebbe $[O_2]$ molto basse, per cui l' O_2 diffonderebbe più lentamente all'interno delle cellule. Un insufficiente apporto di O_2 non permetterebbe il veloce metabolismo

ossidativo che abbiamo.

La relazione tra regolazione ed effetto cooperativo sarà ancora analizzata con la descrizione di proteine di nota attività biologica (Hb cap. 6 ed enzimi cap. 7). Possedere o non possedere l'effetto cooperativo, o averlo positivo o negativo, è in relazione alla selezione che ha subito la proteina al fine di svolgere la sua funzione biologica. I modelli proposti per descrivere l'effetto cooperativo (sequenziale e della simmetria di conformazione), devono essere considerati come strumenti per introdursi allo studio della regolazione molecolare. Infatti le proteine dotate di associazione cooperativa del substrato fino ad ora studiate, non seguono o seguono in parte i modelli sopra indicati. L'evoluzione molecolare è basata sulla selezione di molecole proteiche che svolgono in maniera migliore la loro funzione, e quindi include, con l'evoluzione della funzione, anche l'evoluzione della regolazione della funzione stessa. La più semplice regolazione è per variazione della $[L]$ di una proteina non regolata, la regolazione è resa più efficiente dall'effetto cooperativo e dalla sensibilità a composti diversi dal legante (effettori).

La natura è molto opportunistica, nel senso che opera in genere piccole variazioni sulla stessa struttura molecolare che risultano in grosse differenze di funzione. Una proteina con relativamente piccoli cambiamenti strutturali può passare da proteina di deposito non regolata (Mb) a proteina di trasporto regolata (Hb).

Proteine regolate da effettori e dotate di associazione cooperativa del substrato.

Queste proteine hanno ambedue le proprietà di regolazione della spontaneità di associazione, operate da effettori e per cooperatività. Queste proteine sono oligomeri ed hanno su ciascuna subunità un sito di legame per il legante-substrato (sito attivo) ed uno per ogni legante-effettore (sito di regolazione).

Consideriamo una proteina che sia dotata di associazione cooperativa secondo il modello della simmetria di conformazione del legante substrato (L_S), quello su cui esercita la sua funzione, e sia regolata da un inibitore ed un attivatore (fig. 3-10). E' sufficiente che l'inibitore (L_I) si leghi alle subunità nella conformazione inattiva perchè causi una inibizione della proteina. L'inibitore, legandosi con alta affinità alla proteina nella conformazione inattiva, la stabilizza riducendo il numero di molecole proteiche disponibili a cambiare conformazione per incrementi di concentrazione del substrato. L'inibitore esercita la sua azione associandosi non cooperativamente alla proteina (fig. 3-10e).

Mantenendo costante la $[L_I]$ e la $[P]$ ed incrementando $[L_S]$ si riesce comunque a saturare la proteina di L_S , ma occorrono concentrazioni maggiori di L_S . L_I si comporta come un inibitore competitivo di L_S perchè sulla proteina può essere legato o L_S o L_I perchè la presenza dell'uno esclude quella dell'altro (vedere cap. 4).

La curva di saturazione da L_S in presenza di L_I rimane

sigmoide ma ha un maggior effetto cooperativo, essendo spostata verso destra rispetto a quella in assenza di L_1 (fig. 3-10c).

Analogo ragionamento si può fare per l'attivatore che è un legante che ha alta affinità per la proteina nella conformazione attiva. L'azione dell'attivatore (L_A) sposterà l'equilibrio di conformazione verso destra facendo aumentare la quantità di proteina nella conformazione attiva. La curva di saturazione risulta spostata verso sinistra rispetto a quella in assenza di effettore con una riduzione dell'effetto cooperativo. Per concentrazioni saturanti di attivatore l'effetto cooperativo è fortemente ridotto o annullato e la curva di saturazione è un'iperbole. Si assume che in queste condizioni la quasi totalità delle molecole di proteina sia nella conformazione attiva (vedere fig. 3-10c). L'attivatore si lega cooperativamente alla proteina (fig. 3-10d) ed interagisce con la proteina con un meccanismo identico a quello del substrato, l'unica differenza è che la proteina esercita la sua attività biologica solo sul legante substrato.

La regolazione da effettore di una proteina dotata di associazione cooperativa positiva del substrato può essere spiegata anche con il modello sequenziale, assumendo che l'inibitore si leghi preferenzialmente alle subunità nella conformazione inattiva e l'attivatore a quelle nella conformazione attiva. Le curve di saturazione risulteranno identiche a quelle descritte per la proteina che segue il modello di simmetria di conformazione, per cui dalle curve di saturazione non è possibile identificare il tipo di meccanismo cooperativo di una proteina (vedere fig. 3-10c,d,e). Ciò è possibile solo se si conoscono le strutture delle diverse conformazioni che la proteina può assumere (vedere cap.6).

Inibizione ed attivazione della funzione biologica di proteine non regolate.

Le proteine non regolate possono essere inibite, nella loro funzione di associare il substrato, da normali composti cellulari che aumentano in quantità abnormi nella cellula, come in certe malattie metaboliche, o perchè sono immessi in eccesso nell'organismo per via parenterale. Inoltre le proteine possono essere inibite da composti non prodotti dalla cellula in cui sono presenti. Questi composti possono essere stati sintetizzati da altre cellule animali o vegetali (es, veleni, antibiotici, droghe, ecc.) o sintetizzati dall'uomo (farmaci, prodotti industriali, ecc.) e giungono alle cellule con l'alimentazione, con la respirazione o per via parenterale. La loro azione sulle proteine di un organismo è in genere da considerarsi dannosa perchè altera la normale regolazione cellulare. Da questa considerazione vanno esclusi i farmaci che vengono somministrati per ristabilire una alterazione del metabolismo presente nella cellula.

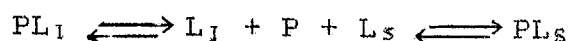
I meccanismi con cui un inibitore non fisiologico può agire su proteine non regolate monomeriche sono due:

a) Inibizione competitiva pura. L'inibitore (L_I) si lega al sito attivo ed impedisce l'associazione del substrato (L_S) al sito stesso. L'inibitore è detto competitivo perchè è in competizione con il substrato per il sito attivo.

L'inibitore ha una molecola strutturalmente molto simile al substrato (analogo del substrato), per cui il sito attivo non è in grado di discriminare i due composti (es. il CO è inibitore competitivo dell'Hb e si lega nello stesso sito dell'O₂).

Quando il sito attivo è occupato dall'inibitore non può legare il substrato, si formano meno complessi proteina-substrato perchè parte della proteina è complessata con l'inibitore e quindi sottratta all'interazione con il substrato. Le quantità relative dei due complessi (PL_I e PL_S) variano in relazione alle concentrazioni relative dei due leganti (inibitore e substrato) ed ai rispettivi valori di affinità per la proteina.

Variando la concentrazione dell'inibitore si fa variare la concentrazione del complesso Proteina-substrato:



E' vero anche il contrario, variando la concentrazione di L_S si fa variare la concentrazione del complesso PL_I .

Quindi se la $[L_I]$ è costante, aumentando $[L_S]$ l'inibizione competitiva viene rimossa ed L_S può associare tutta la proteina, tuttavia occorreranno concentrazioni maggiori di quelle che occorrono in assenza di inibitore (vedere fig. 3-11).

Quando, l'inibitore ha per la proteina una affinità molto più alta di quella del substrato, l'associazione di L_I con P non è reversibile e non può essere rimossa incrementando la $[L_S]$. In questo caso, non si ha più una inibizione definibile come competitiva, che per definizione deve essere reversibile, ma l'inattivazione della proteina, e

corrisponde alla perdita costante, poichè irreversibile, di tutte le molecole di proteina che sono legate all'inibitore.

b) L'inibitore non fisiologico può legarsi sulla superficie della molecola proteica (non nel sito attivo) e indurre una alterazione della conformazione della proteina, per cui il sito attivo risulta non o meno affine al substrato. Poichè l'associazione dell'inibitore alla proteina esclude quella del substrato e viceversa, l'incremento della concentrazione dell'uno riduce il numero dei complessi che la proteina forma con l'altro, così come avviene nel caso a) (inibizione competitiva pura). La differenza dei due tipi di inibitore è nel loro meccanismo di azione ed inoltre l'inibitore che agisce sul sito attivo ha una struttura simile al substrato mentre l'altro no; tuttavia l'influenza dei due tipi di inibitore sulla formazione dei complessi PL_S risulta identica e reversibile (vedere fig. 3-11). Anche con inibitori competitivi di tipo b), se l'affinità dell'inibitore per la proteina è tale da rendere la dissociazione del complesso irreversibile nelle condizioni cellulari, si ha l'inattivazione della proteina.

Un composto che agisca sulla superficie della molecola, come l'inibitore di tipo b) sopra indicato, può causare una attivazione (fig. 3-11) quando la distorsione causata nella

conformazione della proteina causa un incremento dell'affinità verso il substrato. Questa possibilità è esclusa per l'inibitore competitivo puro perchè si lega al sito attivo.

L'inibizione e l'attivazione, sopra descritte, hanno lo stesso meccanismo d'azione della regolazione allosterica, non è tuttavia una regolazione fisiologica perchè il sito di legame di questi composti non è geneticamente determinato anche se può essere altamente specifico e ad alta affinità. La possibilità di associazione è una casualità dovuta all'assunzione di sostanze non naturali, inquinanti, veleni naturali, ecc.. Questa associazione è spesso dannosa nei soggetti normali, mentre è utilizzata in senso positivo nei pazienti con un opportuno uso dei farmaci.

Anche le proteine regolate possono essere attivate od inibite non fisiologicamente con i meccanismi sopra indicati, cioè da analoghi del substrato che si legano al sito attivo, da analoghi degli effettori che si legano ai siti di regolazione. Gli analoghi degli effettori inibiscono l'associazione dell'effettore con la proteina nel rispettivo sito, tuttavia essi stessi, essendo legati al sito di regolazione, possono causare la stessa azione dell'effettore (in questo caso sono detto agonisti dell'effettore) oppure renderlo inattivo impedendo che esso associ l'effettore naturale (antagonisti). Inoltre le proteine regolate possono essere inibite od attivate da composti che si legano sulla loro superficie (e non nei siti), come visto per le proteine non regolate. Proteine regolate e non regolate possono essere inattivate oltre che da composti che hanno per la proteina altissima affinità, anche da composti che si legano covalentemente ad esse. L'inattivazione è una alterazione irreversibile della proteina e può essere realizzata anche con mezzi fisici (calore, radiazioni) che alterino irreversibilmente la struttura naturale (terziaria o quaternaria) della proteina. Si ha cioè la denaturazione della proteina.

La cellula è organizzata contro queste evenienze degradando specificamente le proteine danneggiate e sintetizzandone di nuove (vedere cap. 7, turnover)

Fig. 3-1

Schema delle variazioni di energia libera standard dei cambiamenti conformazionali di una proteina monomerica regolata da un legante effettore positivo (attivatore) (da B. Alberts et al., Molecular Biology of the Cell, p. 126, ridisegnato e modificato).

P_A = proteina nella conformazione biologicamente attiva

P_I = proteina nella conformazione biologicamente inattiva

L_A = legante effettore positivo o attivatore

L_S = legante substrato, legante sul quale la proteina svolge la sua attività biologica (es. deposito, trasporto, catalisi, ecc.), il suo sito sulla proteina è detto sito attivo.

Il sito di legame per l'effettore e per il substrato, in figura sono indicati aperti se sono capaci di associare i rispettivi leganti, ed in forma più chiusa quando sono incapaci a fare ciò. Le frecce indicano la direzione dei cambiamenti di conformazione della proteina, il loro spessore è in relazione alla velocità del cambiamento di conformazione. La freccia più spessa indica anche la conformazione prevalente quando è raggiunto l'equilibrio di conformazione. La proteina regolata può assumere due conformazioni che differiscono per una piccola quantità di energia libera (4,3 kcal/mole nell'esempio in figura). Questa energia, che è fornita da energia cinetica delle molecole a 37°C, deve cedere alla proteina per spezzare 4-5 legami deboli per permettere il passaggio dalla conformazione a minor contenuto energetico a quella a maggior contenuto energetico e meno stabile relativamente all'altra conformazione. In assenza di leganti la proteina si troverà prevalentemente nella conformazione a minor contenuto di energia libera, con una proporzione di 1000 molecole in questa conformazione ed 1 molecola nella conformazione a maggior contenuto di energia libera. La proteina nella conformazione più stabile non ha affinità per il legante substrato (conformazione inattiva), mentre la stessa proteina nella conformazione a più alto contenuto energetico, ha alta affinità per il legante substrato (conformazione attiva).

In assenza di effettore la proteina sarà scarsamente attiva perchè solo una per ogni 1001 delle sue molecole è capace di associare con alta affinità il substrato. La presenza del legante effettore fa spostare l'equilibrio di conformazione verso la conformazione a maggior contenuto energetico (attiva). I meccanismi ipotizzati sono due, descritti in a) e b).

a) (vedere anche fig. 3-3a e 3-4a) Il legante effettore positivo (L_A) può legarsi alla proteina solo quando è nella conformazione attiva (P_A) che stabilizza formando con la proteina un certo numero (circa sette) di legami deboli. L_A ha un'alta affinità per la proteina nella conformazione P_A ($K_A = 10^5 \text{ M}^{-1}$) e nessuna per la conformazione P_I . Con la formazione dei legami deboli tra P ed L_A viene liberata una quantità di energia libera (-7,1 kcal/mole nell'esempio) che è superiore a quella che stabilizza la conformazione P_I (+4,3 kcal/mole) e si oppone al passaggio della proteina

dalla conformazione attiva (P_A) a quella inattiva (P_I).
 Risulta così che la proteina che ha associato il legante
 effettore ha una conformazione attiva con un contenuto di
 energia libera che è inferiore di 2,8 kcal/mole a quello
 della stessa proteina nella conformazione inattiva.
 In presenza di effettore, la conformazione attiva risulta
 più stabile di quella inattiva e l'equilibrio tra queste due
 forme è ora spostato verso la conformazione attiva.
 Nell'esempio in figura, in presenza di [effettore] saturanti
 P_A , ci sono 100 molecole di P_A per ogni molecola di P_I .
 In assenza di effettore, la costante di equilibrio tra le
 due conformazioni (costante di conformazione K_c)

$$K_c = \frac{[P_A]}{[P_I]} = 10^{-3}$$

ed in presenza di effettore:

$$K_{eq} = \frac{[P_A L_A]}{[P_I][L_A]} = 10^2$$

La K_A di L_A per la proteina P è 10^2 ; essa risulta dalla
 somma della K_A di L_A per P_A (10^5) con K_c (10^{-3}). Sebbene
 pochissime molecole di P siano nella conformazione P_A
 (capace di associare L_A), la possibilità di cambiare
 conformazione permette alle molecole di proteina di
 associare L_A in proporzione di 100 ogni 1 molecola di P
 libera. Se la proteina fosse tutta nella conformazione P_A ,
 la proporzione sarebbe 100.000 ad 1. La differenza nel
 valore delle due proporzioni è il costo di energia libera
 richiesta per il cambiamento di conformazione da P_I a P_A .
 Notare che nella conformazione inattiva la proteina non ha
 affinità per l'effettore e per il substrato e nella
 conformazione attiva ha alta affinità per ambedue.

b) (vedere anche figg. 3-1b e 3-4b) Il legante effettore
 positivo si lega alla proteina nella conformazione inattiva
 e la induce ad assumere la conformazione attiva. Quando la
 proteina associa il legante effettore, si crea tensione
 all'interno di essa, perchè i legami che si formano tra P
 ed L_S causano dei piccoli spostamenti dei residui del sito
 di regolazione. A questi spostamenti si oppongono dei legami
 deboli intramolecolari della proteina che stabilizzano la
 proteina nella conformazione inattiva P_I . La proteina
 rimuove questa tensione (in genere causata dai suoi atomi
 che si trovano più vicini tra loro dei rispettivi raggi di
 van der Waals o da stiramento di legami a H o a H-salini)
 assumendo una nuova conformazione e spezzando i legami
 deboli che stabilizzavano la conformazione inattiva.
 L'energia per assumere la nuova conformazione (P_A) è data
 dalla formazione dei legami deboli tra P - L_A che sono in
 numero maggiore di quelli che stabilizzano P_I . Nella nuova
 conformazione la proteina ha un'alta affinità verso il
 legante substrato (conformazione attiva). In figura si vede
 che la proteina, per passare dalla conformazione inattiva
 (P_I) alla conformazione attiva (P_A), deve attraversare uno

stadio intermedio (P^*) ad un livello di energia libera più alto. P^* ha le caratteristiche di un complesso attivato, corrisponde allo stadio in cui P ed L_A interagiscono tra loro, ma l'energia dei legami deboli che li unisce (o di parte di essi) non è stata liberata perchè alla loro formazione si oppongono legami deboli che stabilizzano la proteina nella conformazione P_I (tensione molecolare). Se la proteina cambia conformazione assumendo la conformazione attiva (P_A), parte dell'energia liberata dalla formazione dei legami del complesso $P-L_A$ viene utilizzata per spezzare i legami che stabilizzavano P e parte viene liberata come calore. Altra energia libera può essere liberata se nella nuova conformazione la proteina forma altri legami deboli con L_A e/o all'interno della sua molecola.

L'affinità di L_A per P , che non è altissima ($K_a = 10^2$), è sufficiente per regolare la proteina P . Incrementi di $[L_A]$ spostano proporzionalmente l'equilibrio di conformazione da sinistra (conformazione inattiva) a destra (forma attiva); decrementi di $[L_A]$ fanno ritornare l'equilibrio di conformazione verso sinistra. Tutte le variazioni di $[L_A]$ sono associate a rapidi cambiamenti di conformazione di P perchè le quantità di energia libera richieste per cambiare conformazione e per dissociare il complesso $P-L_A$ sono relativamente piccole e sono fornite dall'agitazione e vibrazione delle molecole provocate dal calore.

Quindi la $[L_A]$ regola finemente l'attività biologica di P . La $K_a = 10^2$ della reazione tra P ed L_A risulta da due componenti opposte: dalla forza di legami deboli tra P ed L_A e dalla resistenza della P_I a cambiare conformazione.

In fig. b, si assume che in assenza di L_A , tutte le molecole della proteina siano nella conformazione inattiva P_I e che anche in eccesso di L_S non si formino complessi $P-L_S$.

In fig. a e b, per semplicità, si è considerato il caso in cui le proteine nella conformazione inattiva non abbiano affinità per L_S , tuttavia il meccanismo di regolazione rimane valido anche se P_I ha un certo valore di affinità per P_L ; questo valore deve essere inferiore a quello che P_A ha per L_S .

Come indicato nel testo e nelle figure 3-3b e 3-4b, si assume che la proteina, in assenza di L_A , sia tutta nella conformazione inattiva e che anche in eccesso di $[L_S]$ non si formino complessi $P-L_S$.

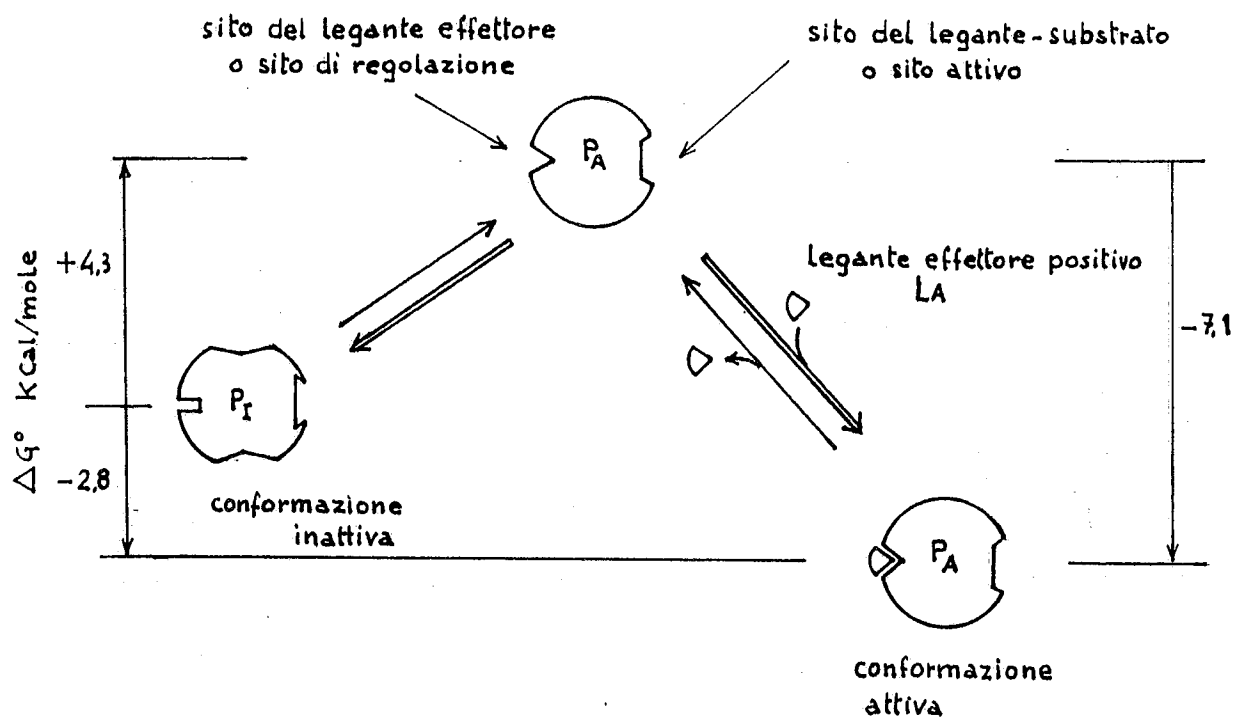


Fig. 3-1 (a)

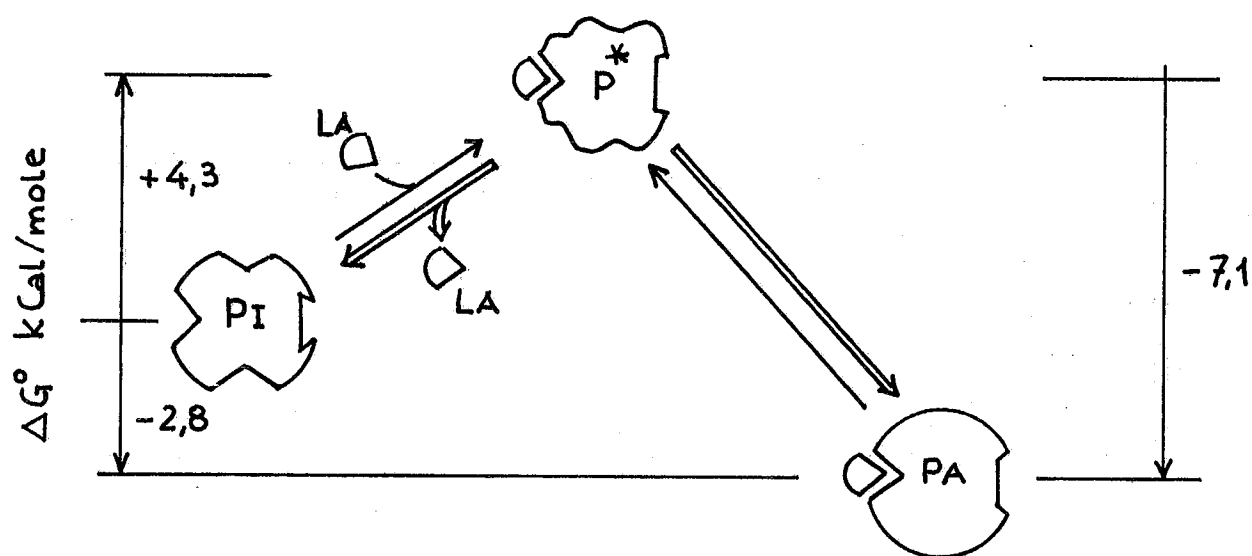


Fig. 3-1 (b)

Fig. 3-2

Schema della variazione di energia libera standard dei cambiamenti di conformazione di una proteina oligomerica regolata da un legante effettore negativo (inibitore). Gli schemi sono concettualmente identici a quelli indicati nella figura 3-1, con la differenza che la conformazione più stabile della proteina è quella biologicamente attiva.

Quindi, in assenza dell'inibitore (L_I), la proteina si trova prevalentemente (a) o esclusivamente (b) nella conformazione attiva (vedere anche figg. 3-3c e d, e 3-4c e d).

In figura a e b, per semplicità, si è assunto che P_I non abbia nessuna affinità per L_S , tuttavia il meccanismo di regolazione può operare anche se P_I ha un certo valore di affinità per L_S , ma questo valore deve essere minore di quello che P_A ha per L_S .

Per simboli ed altri dati vedere fig. 3-1.

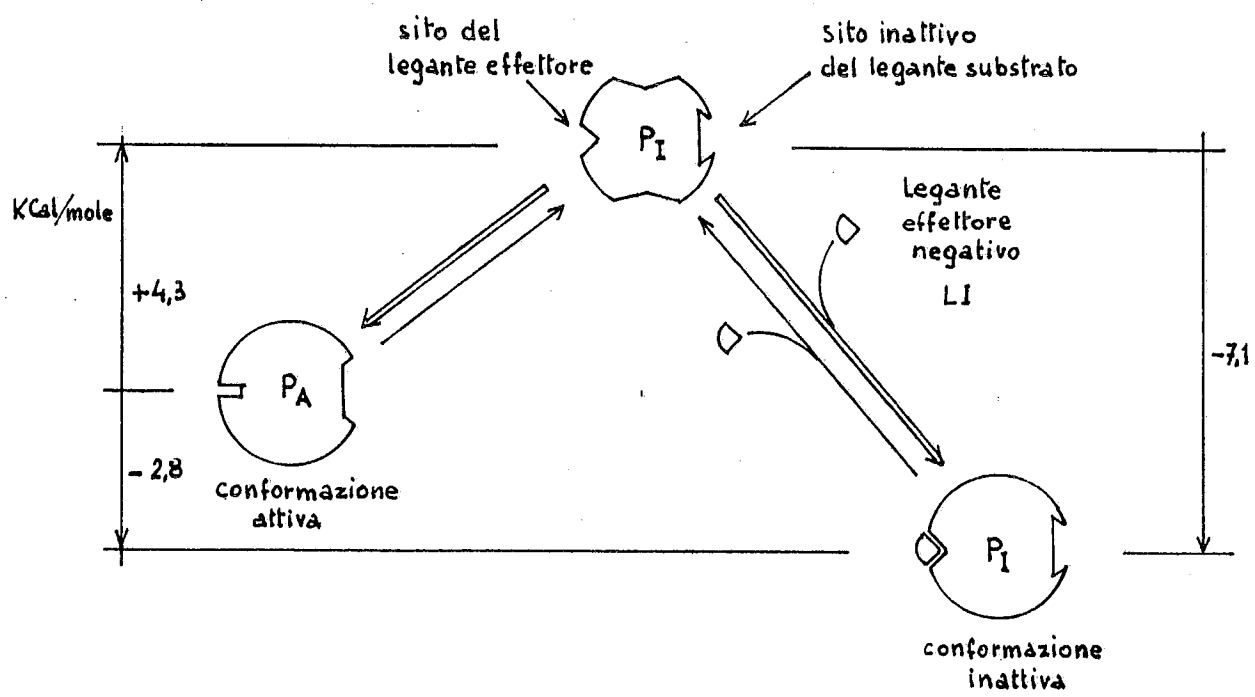


Fig. 3-2 (a)

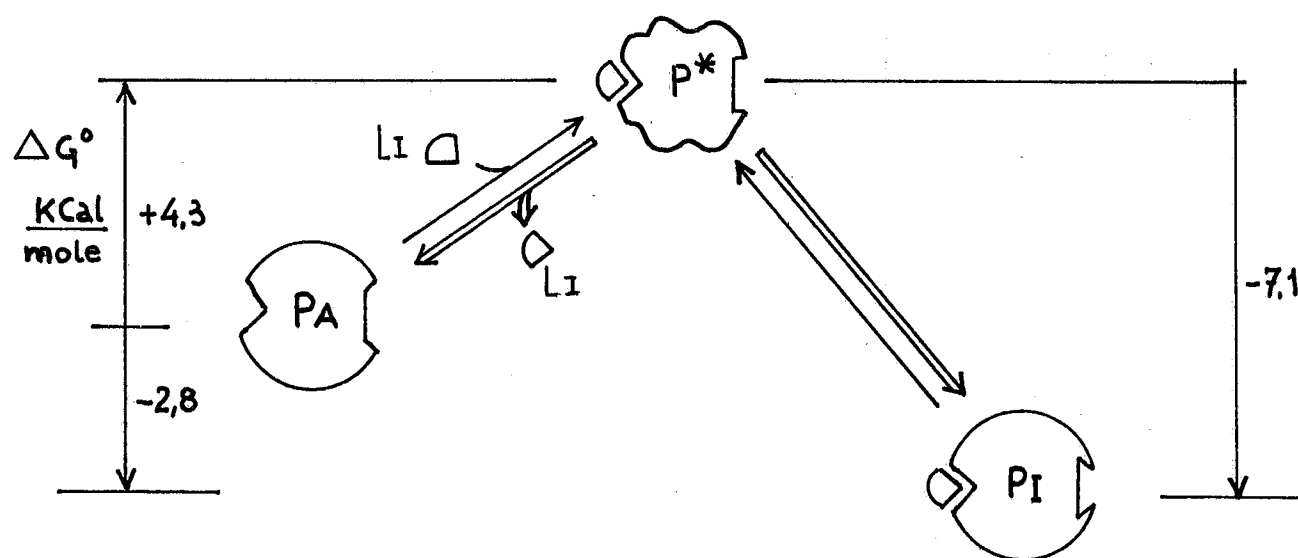


Fig. 3-2 (b)

Fig. 3-3

Curve di saturazione da substrato di proteine regolate da effettori.

a) La proteina è la stessa descritta nelle figure 3-1a e 3-4a. La proteina esiste in due conformazioni: P_1 , conformazione non affine al substrato (L_s) e P_A , conformazione affine a L_s . La proteina si trova prevalentemente nella conformazione inattiva, ma una certa concentrazione di P_A è presente anche in assenza dell'attivatore (L_A). Per cui, anche a basse concentrazioni di L_s , si formano complessi P_A-L_s (curva 1), ed incrementando molto la concentrazione di L_s si sposta l'equilibrio di conformazione e tutta la proteina può essere convertita in P_A sotto forma di complesso P_A-L_s . L'asse delle ascisse è interrotto per indicare punti di concentrazione molto alti in cui la proteina è saturata da L_s . Le curve 2 e 3 sono curve di saturazione da L_s della stessa proteina posta in presenza di due diverse concentrazioni di L_A , rispettivamente la prima [L_A] (curva 2) minore della seconda [L_A] (curva 3). In presenza di L_A , l'affinità della proteina per L_s è aumentata perchè L_A fa aumentare il numero delle molecole di proteina nella conformazione attiva P_A . In particolare la curva 3, descrive la curva di saturazione da L_s della proteina saturata da L_A , cioè con la quasi totalità delle sue molecole nella conformazione P_A .

b) La proteina è la stessa descritta nelle figg. 3-1b e 3-4b. La proteina, in assenza dell'attivatore L_A , è esclusivamente nella conformazione inattiva P_1 , per cui il substrato non può legarsi alla proteina ed un incremento della sua concentrazione non può spostare l'equilibrio di conformazione (curva 1). La curva 1 è tratteggiata per indicare che coincide con l'asse delle ascisse e che non si formano complessi P_A-L_s ed anche che non si formano complessi P_1-L_s .

Le curve 2 e 3 sono le curve di saturazione da L_s della proteina in presenza di due diverse concentrazioni di L_A . In presenza di L_A la proteina ha affinità per L_s ed essa è in relazione diretta alla [L_A]. L_s non influenza l'equilibrio di conformazione perchè si ammette che la proteina possa passare da P_1 a P_A solo se prima associa L_A che induce il cambiamento di conformazione. Anche saturando la proteina con L_s non si arriva al 100% di saturazione (curva 2) se la [L_A] non è sufficiente a convertire tutta la proteina nella conformazione P_A . La proteina può essere saturata da L_s solo con [L_A] saturanti la stessa proteina (curva 3).

c) La proteina è la stessa descritta nelle figg. 3-2a e 3-4c. La proteina è prevalentemente nella conformazione attiva. Il substrato L_s si lega con alta affinità alla forma P_A e può spostare l'equilibrio di conformazione verso P_A (curva 1). In presenza dell'inibitore L_i viene ridotto il numero delle molecole di P nella conformazione attiva, per cui a parità di concentrazione di L_s si formeranno meno complessi P_A-L_s . Tuttavia, incrementando la [L_s] si può rimuovere l'inibizione (vedere curve 2 e 3). L'entità della rimozione dipende dai rispettivi valori delle concentrazioni e delle affinità per la proteina dell'inibitore L_i e del substrato L_s . Incrementando la [L_s] si arriva sempre a

saturare P.

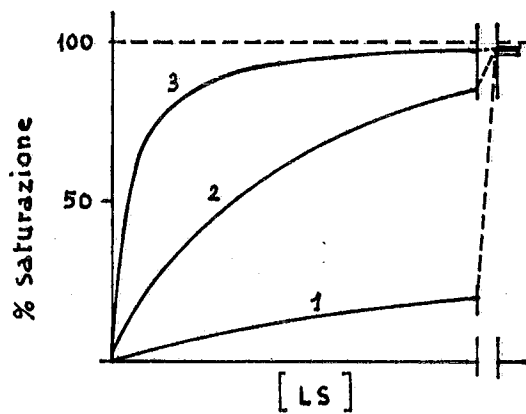
d) La proteina è la stessa descritta in figg. 3-2b e 3-4d. La proteina, in assenza di inibitori, è solo nella forma P_A e quindi ha una affinità per L_S maggiore di quella della proteina al punto c. A parità di concentrazione, la proteina al punto c ha una frazione delle sue molecole nella conformazione P_I . La differenza è minima e dipende dal valore dell'equilibrio di conformazione della proteina al punto c, che è comunque molto spostato verso la forma P_A . La differenza di affinità è poco apprezzabile confrontando le curve di saturazione in figura. L'incremento di concentrazione di L_S può rimuovere l'inibizione da L_I . L'entità della rimozione è in relazione ai rispettivi valori delle concentrazioni e delle affinità di L_I ed L_S . Incrementando la $[L_S]$ si arriva a saturare P.

L'affinità dei quattro tipi di proteina a, b, c, d, è regolata dalla concentrazione dei rispettivi effettori, che controllando le quantità relative delle due conformazioni P_A e P_I , permette di variare la concentrazione dei complessi $P-L_S$ anche quando la $[L_S]$ rimane costante. Il meccanismo ha tutte le caratteristiche di base della regolazione (velocità e reversibilità) perchè basato su reazioni di associazione e dissociazione di complessi che richiedono piccoli apporti di energia libera che sono forniti dall'agitazione delle molecole. Gli inibitori delle proteine c e d si comportano come inibitori competitivi, la loro associazione alla proteina esclude quella del substrato e viceversa, senza interagire nello stesso sito. La mediazione è operata dalla proteina mediante il cambiamento di conformazione.

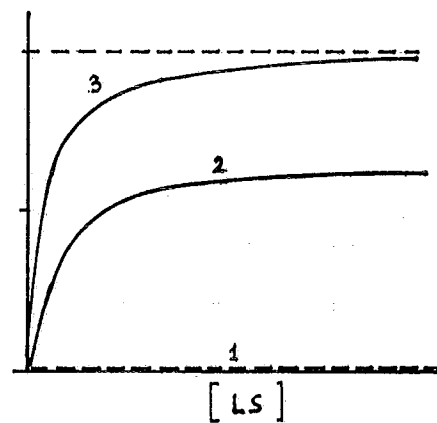
In tre tipi di proteina (a, c, d) si formano complessi $P-L_S$ anche in assenza di L_A (proteina a) ed in presenza di concentrazioni saturanti di inibitore L_I (proteine c e d). Questa possibilità non elimina la regolazione da effettore che ha la sua funzione principale nel regolare la $[P-L_S]$ anche quando la $[L_S]$ rimane costante.

La natura, con la selezione, sceglie quale tipo di regolazione è più adatto a regolare, ed in molti casi appare opportuno avere una attività biologica basale senza interventi di regolazione.

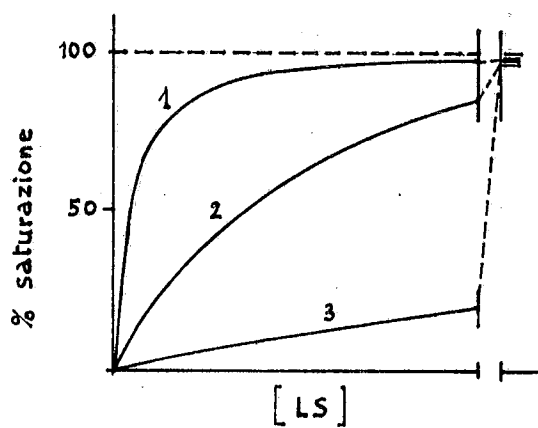
a) (ved. fig. 3-1a 3-4a)



b) (ved. fig. 3-1b 3-4b)



c) (ved. fig. 3-2a 3-4c)



d) (ved. fig. 3-2b 3-4d)

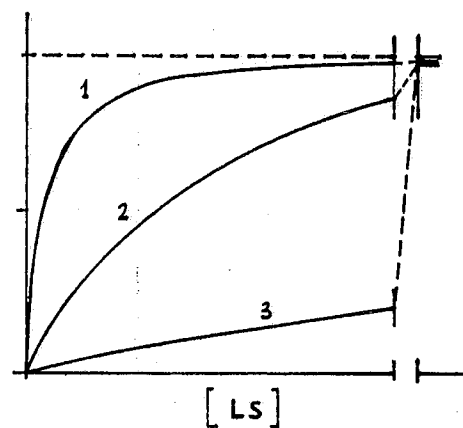


Fig. 3-3

Fig. 3-4

Schema delle variazioni di energia libera delle reazioni di associazione con l'effettore e il substrato di una proteina regolata.

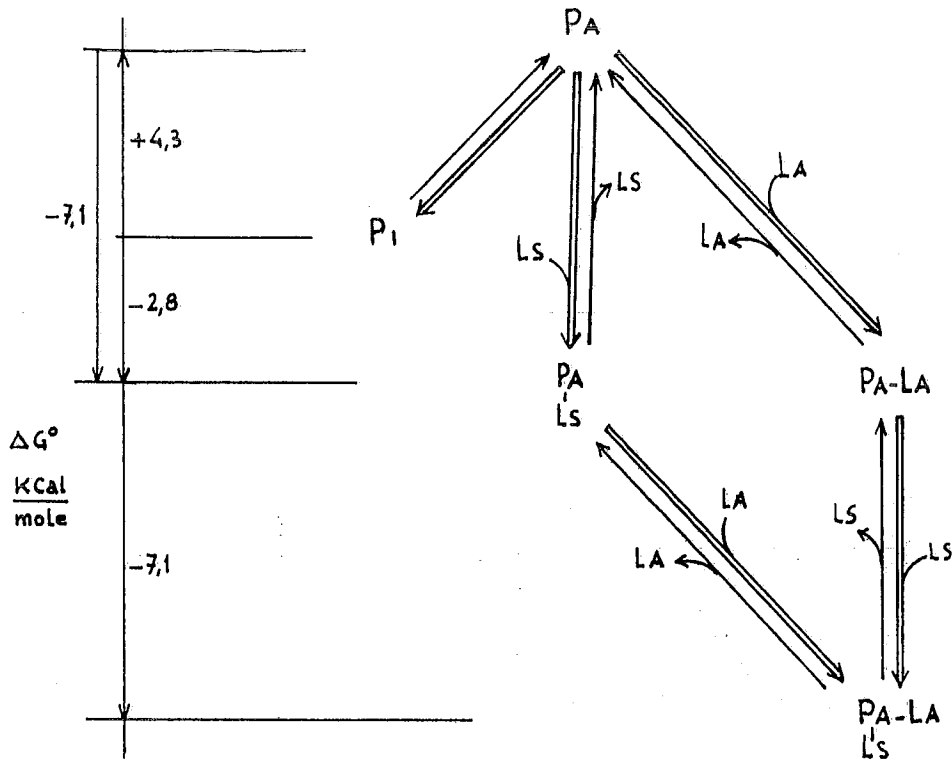
a) La proteina, la stessa descritta nelle figg. 3-1a e 3-3a, in assenza di attivatore è prevalentemente nella conformazione inattiva. L'effettore è attivatore (L_A) ed il substrato (L_S), stabilizzano la conformazione attiva. Il substrato può legarsi alla proteina anche in assenza di L_A perchè si ammette che un certo numero di molecole di P_A sia sempre presente.

b) La proteina, la stessa descritta nelle figg. 3-1b e 3-3b, in assenza di attivatore è esclusivamente nella conformazione inattiva. L'effettore è attivatore (L_A). in sua assenza tutte le molecole di P sono nella conformazione inattiva P_I . L_S può legarsi alla proteina solo se L_A è presente in soluzione.

c) La proteina, la stessa descritta nelle figg. 3-2a e 3-3c, in assenza di inibitore è prevalentemente nella conformazione attiva. L'effettore è inibitore (L_I). stabilizza la conformazione inattiva mentre il substrato (L_S) stabilizza la conformazione attiva.

d) La proteina è la stessa descritta in figg. 3-2b e 3-3d. In assenza di inibitore la proteina si trova esclusivamente nella forma attiva. L'effettore è inibitore (L_I) e stabilizza la proteina nella conformazione inattiva.

Nelle proteine c e d, l'inibitore ed il substrato sono antagonisti, l'azione dell'uno si oppone a quella dell'altro. Questo spiega perchè anche con $[L_I]$ saturanti non si arrivi all'inibizione completa della proteina (vedere curve di fig. 3-3c e d) e perchè aumentando molto la $[L_S]$ si arrivi a saturare la proteina anche in presenza di inibitore. Per altri dati vedere figg. 3-1, 3-2, 3-3.



(a)

confrontare
con figg.
3-1a e 3-3a

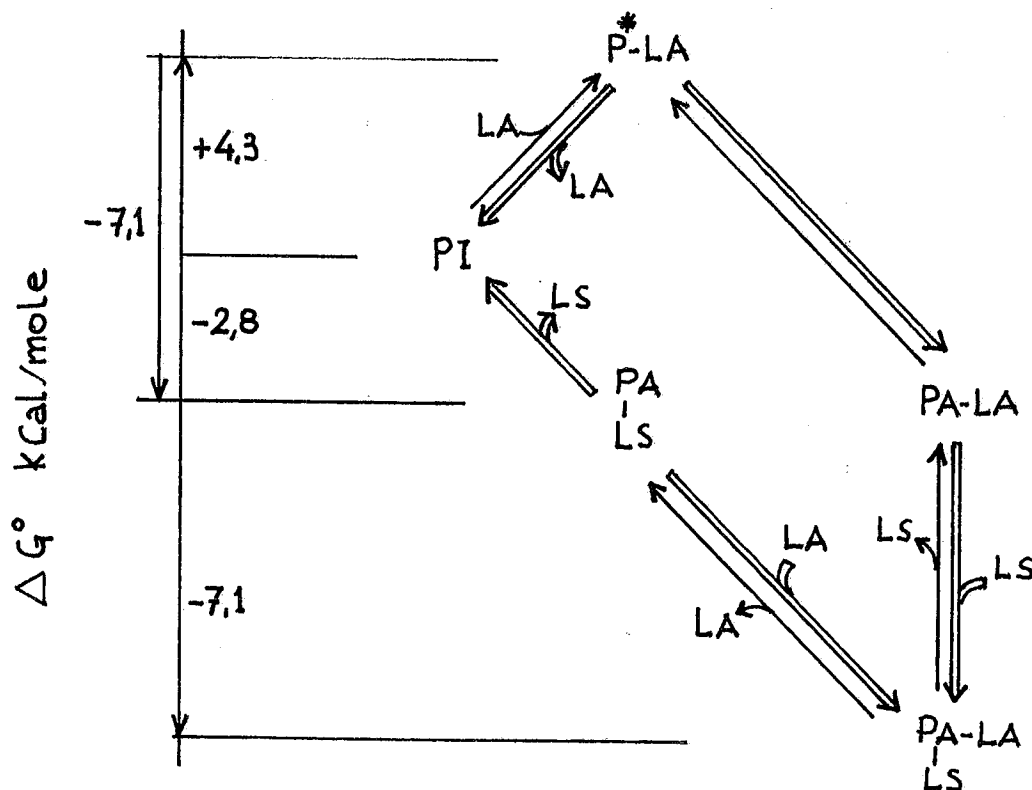
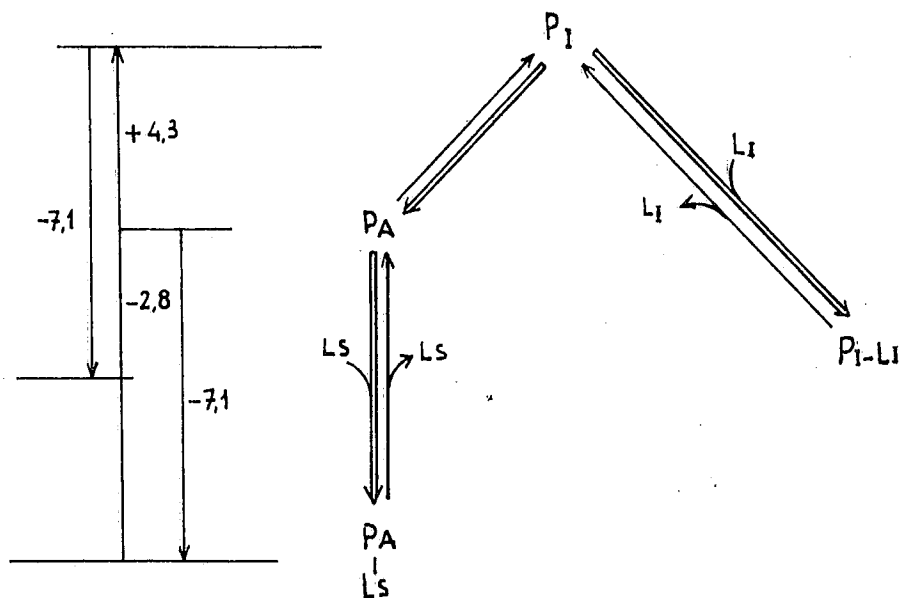


Fig.3-4

(b)

confrontare
con
3-1b e 3-3b

ΔG° KCal/mole



(C)

confrontare
con figg.
3-2a e 3-3c

ΔG° KCal/mole

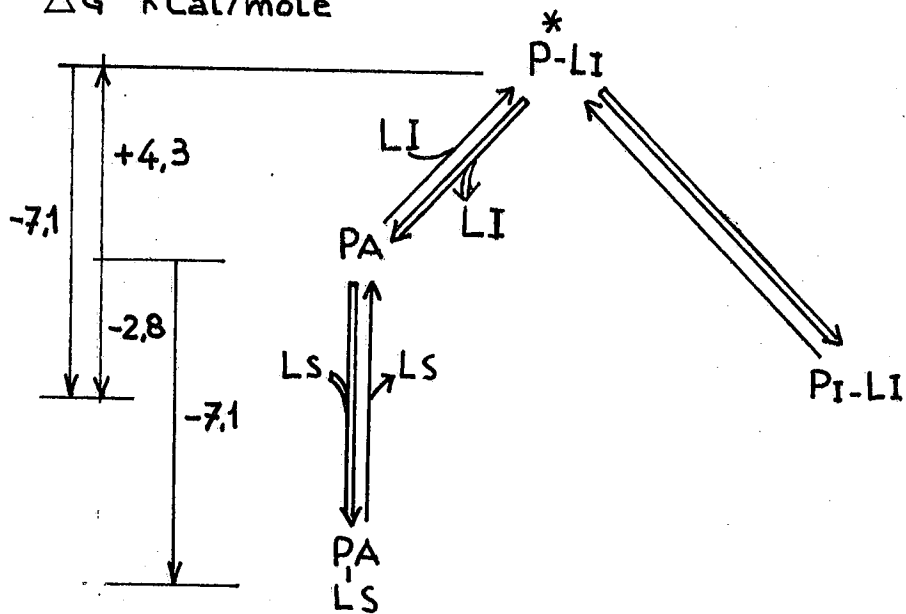


Fig. 3-4

(d)

confrontare
con
3-2b e 3-3d

Fig. 3-5

Schema delle variazioni di energia libera standard dei cambiamenti conformazionali di una proteina monomerica, regolata per mezzo di una reazione covalente (da Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*, p. 126, ridisegnato e modificato).

Le reazioni di fosforilazione e defosforilazione sono indicate con un'unica freccia perchè sono irreversibili nella cellula.

a) e c) La proteina è attivata mediante fosforilazione. La reazione è catalizzata da una proteina-cinasi specifica che trasferisce un gruppo fosforico dall'ATP ad un residuo specifico di serina della proteina. La proteina non fosforilata è nella conformazione inattiva, cioè non affine al legante substrato. In questa conformazione la proteina può partecipare alla reazione cinasica ed al termine della reazione, la presenza del gruppo fosforico legato covalentemente alla molecola proteica, la induce a cambiare conformazione per assumere la conformazione attiva che associa reversibilmente con alta affinità il legante substrato (L_s). La rimozione del gruppo fosforico avviene mediante una reazione che idrolizza il legame estereo con la serina ed è catalizzata da una proteina-fosfatasi specifica. Defosforilata, la proteina riassume la conformazione inattiva (P_i) cedendo l'energia residua ottenuta con la fosforilazione.

Per il gioco degli equilibri (vedi questa figura c) la defosforilazione, promuovendo la riconversione della proteina nella conformazione inattiva, causa, per azione di massa, anche la dissociazione dei complessi proteina- L_s .

b) e d) La proteina non fosforilata è nella conformazione attiva ed ha alta affinità per il substrato (L_s) che associa reversibilmente. La reazione di fosforilazione induce la proteina ad assumere una nuova conformazione incapace ad associare L_s . Questa reazione, facendo diminuire il numero di molecole nella conformazione attiva, provoca, per azione di massa, la dissociazione del complesso P_A-L_s anche se la concentrazione della proteina e del substrato rimangono costanti. In questo modo si ha una riduzione dell'affinità della proteina verso L_s . L'inibizione può essere rovesciata mediante defosforilazione della proteina che dalla conformazione inattiva P_i passa a quella attiva P_A , facendo aumentare di nuovo il numero di molecole affini ad L_s e quindi quello dei complessi P_A-L_s , anche quando la concentrazione totale di P e la concentrazione di L_s rimangono costanti.

Negli schemi è indicato che, con la fosforilazione, il livello energetico della proteina (P_A) aumenta di +5,3 kcal/mole e che l'equilibrio della reazione è spostato verso destra (freccia spessa). L'incremento di energia libera (+5,3 kcal/mole) si riferisce alla proteina fosforilata, cioè ad un solo prodotto di reazione, mentre se consideriamo l'intera reazione abbiamo un $\Delta G^\circ = -2$ kcal/mole. L'idrolisi dell'ATP libera -7,3 kcal/mole, delle quali 5,3 vengono utilizzate per legare l'acido fosforico alla proteina, la rimanente energia libera (-2 kcal/mole) è liberata nella reazione.

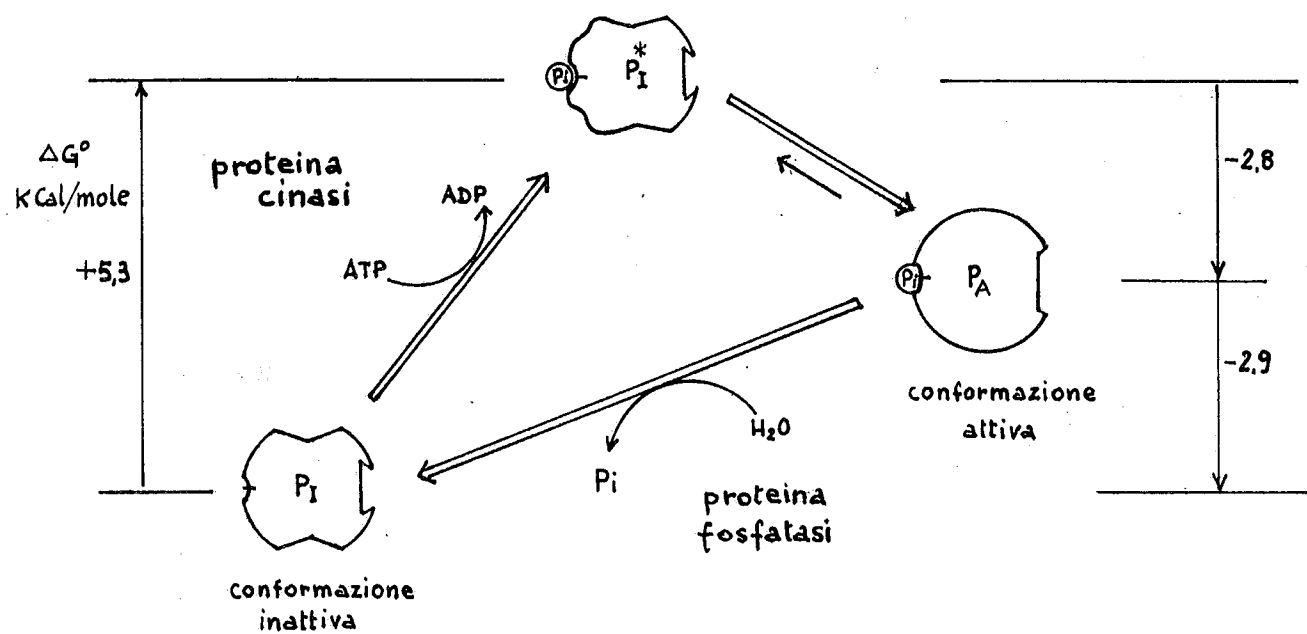


Fig. 3-5 (a)

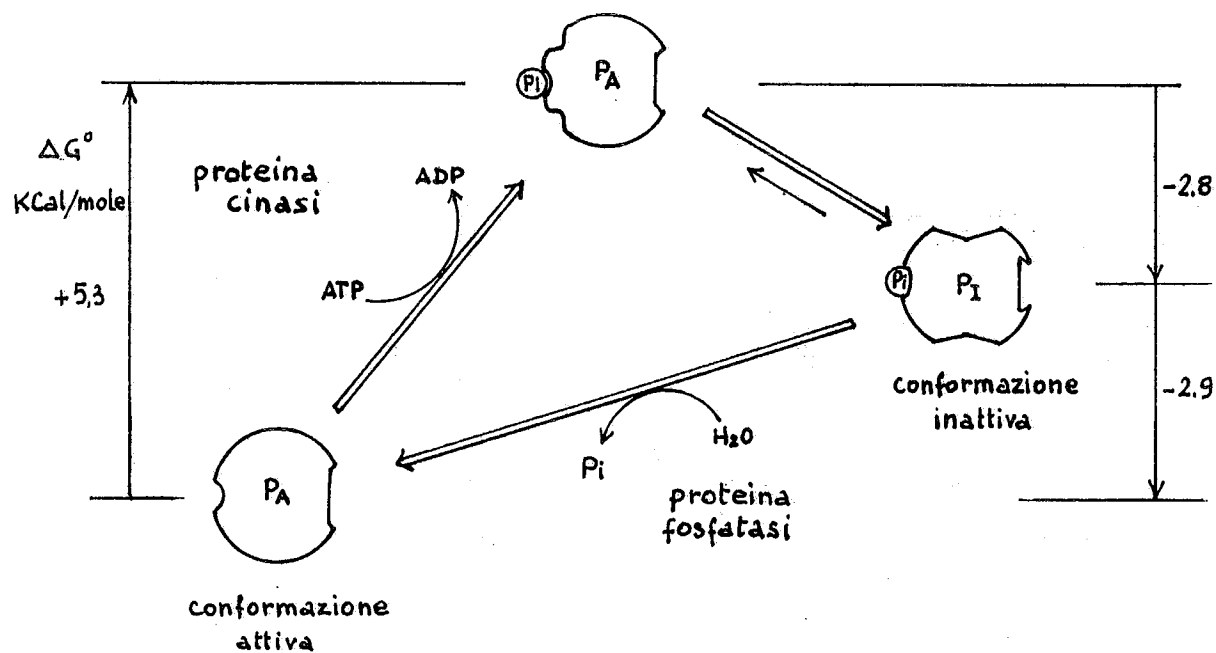


Fig. 3-5 (b)

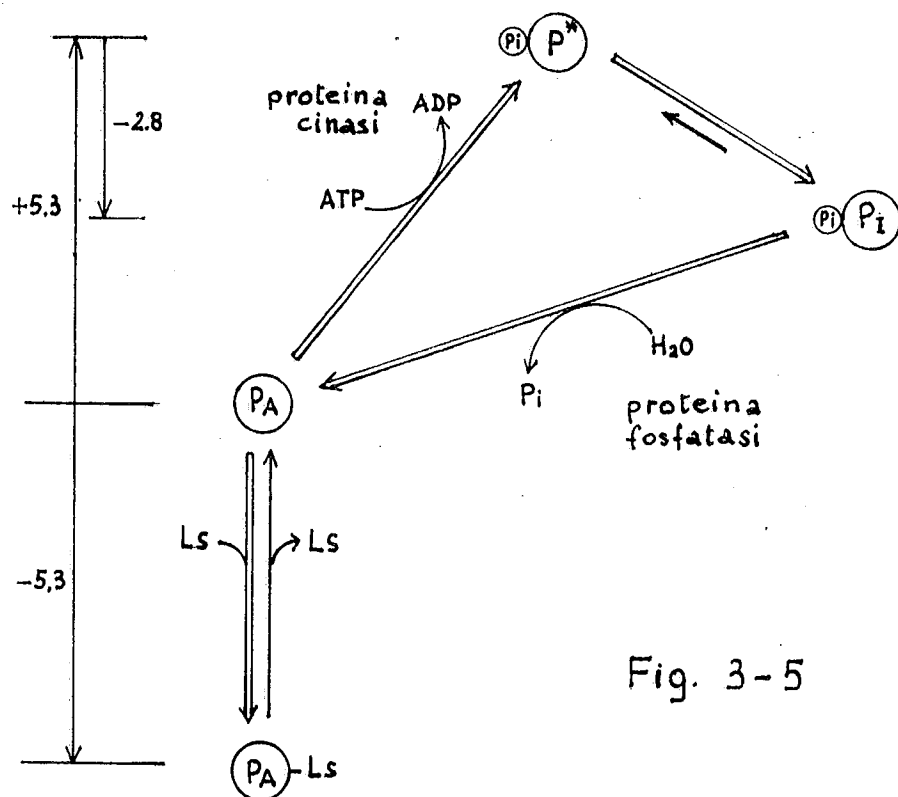
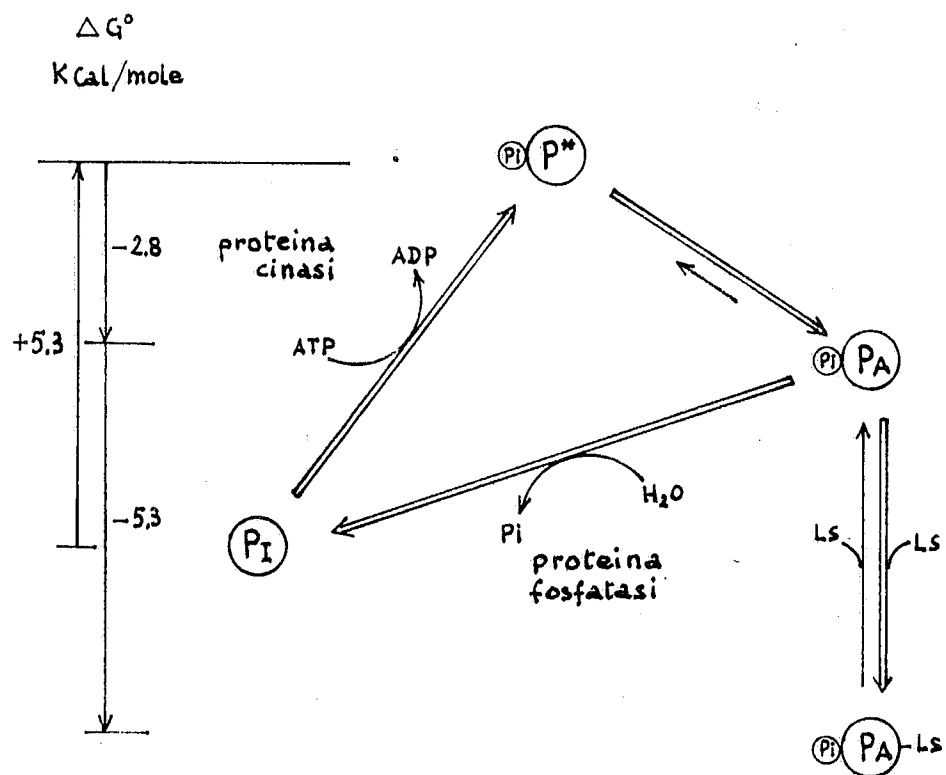


Fig. 3-5

Fig. 3-6

Curve di saturazione da substrato (L_s) di proteine regolate mediante fosforilazione.

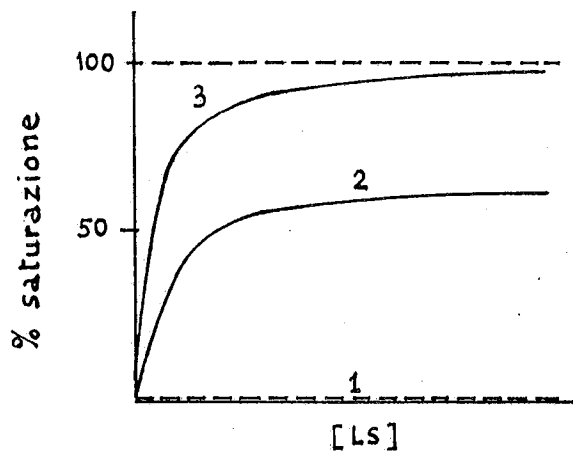
a) La proteina è la stessa descritta nella fig. 3-5a e c. La proteina non fosforilata non ha affinità per il substrato (L_s) ed anche a concentrazioni saturanti di L_s non si formano complessi P- L_s (curva 1). La curva 1 è tratteggiata e coincide con l'asse delle ascisse.

Le curve 2 e 3 rappresentano la curva di saturazione da L_s della stessa concentrazione di proteina di cui rispettivamente una parte e la quasi totalità delle molecole sono state fosforilate e quindi sono nella conformazione affine al substrato. Ad alte concentrazioni di L_s le curve tendono asintoticamente a valori definiti ma diversi di saturazione percentuale, perchè sebbene il substrato stabilizzi la conformazione attiva, non influisce sull'equilibrio di conformazione che è controllato dalle reazioni di fosforilazione e defosforilazione e quindi dall'attività dei relativi enzimi.

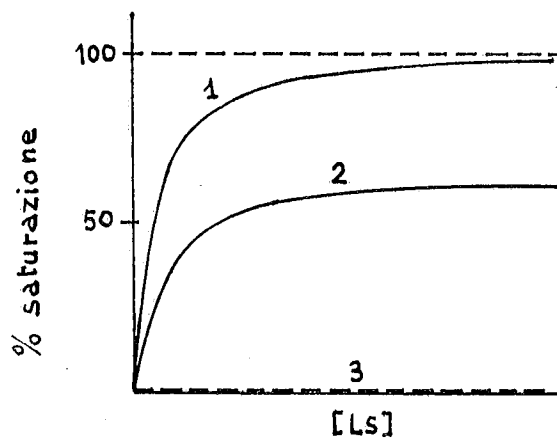
b) La proteina è la stessa della fig. 3-5b e d.

La proteina non fosforilata ha alta affinità per il substrato (curva 1). Le curve 2 e 3 rappresentano le curve di saturazione da L_s della stessa concentrazione di proteina di cui rispettivamente una parte e la totalità delle molecole sono state convertite nella conformazione non affine al substrato. Il legante stabilizza la conformazione attiva, ma anche ad alte concentrazioni non rimuove l'inibizione perchè non influenza l'equilibrio di conformazione (vedere a).

Per semplicità, in figura 3-5 e 3-6 si sono considerate proteine che in una conformazione hanno alta affinità, e nell'altra nessuna affinità per L_s . Il meccanismo di regolazione funziona egualmente anche se la proteina ha affinità per L_s in ambedue le conformazioni, ma con valori diversi tra loro. Se i valori sono uguali non ci può essere regolazione.



a



b

Fig. 3-6

Sono rappresentati i vari aspetti di una reazione di associazione tra una proteina dimerica (P) dotata di effetto cooperativo con il suo legante (L).

Le subunità di P possono esistere in due conformazioni, una non affine ad L (quadrati) ed una affine ad L (cerchi). L'equilibrio di conformazione è spostato verso sinistra per cui, in assenza di L, P si trova prevalentemente nella conformazione in cui ambedue le subunità sono nella conformazione senza affinità per L. La lunghezza delle frecce è proporzionale alla velocità dei cambiamenti di conformazione e delle velocità di reazione di associazione e dissociazione del legante.

Il meccanismo molecolare dell'effetto cooperativo può essere spiegato in due modi:

a) Modello della simmetria di conformazione o concertato proposto da Monod, Wyman e Changeux.

In questo modello la proteina cambia spontaneamente e simultaneamente la conformazione delle due subunità e l'effettore ha alta affinità per la conformazione meno stabile (cerchi). Quando l'effettore L lega una subunità, la stabilizza nella conformazione attiva, quindi stabilizza in questa conformazione anche l'altra subunità perchè nella stessa molecola di dimero le due subunità non sono libere di avere conformazioni diverse dovendo mantenere sempre simmetria di conformazione. Quindi l'associazione alla proteina di una molecola di legante favorisce la legatura (effetto cooperativo) di una seconda molecola di legante sull'altra subunità. Inoltre, un dimero nella conformazione inattiva passerà nella conformazione attiva per ristabilire l'equilibrio alterato dalla sottrazione del dimero che ha associato il legante. Aumentando la [L] il meccanismo può continuare nello stesso modo fino a che tutte le molecole di P hanno associato L su ambedue le subunità (proteina saturata di L).

b) Modello sequenziale proposto da Koshland, Nemethy e Filmer.

In questo modello la proteina può esistere con le subunità in conformazioni diverse (ibrido di conformazione) di cui una affine e l'altra non affine al legante. La proteina associa la prima molecola di legante con scarsa affinità perchè l'associazione di L induce la subunità a cambiare conformazione, e ciò richiede la rottura di alcune interazioni deboli tra le due subunità. La seconda molecola di legante è associata con maggiore affinità della prima perchè, sebbene la seconda subunità associando il legante cambi conformazione esattamente come la prima, questa seconda transizione richiede meno energia perchè i legami intersubunità erano stati già spezzati con il cambiamento di conformazione della prima subunità. Quindi l'associazione della prima molecola di legante coopera all'associazione della seconda. Infatti, il primo legante è legato con scarsa affinità e l'equilibrio è spostato verso sinistra (freccia lunga verso sinistra) e il secondo legante è associato con alta affinità, o comunque con affinità più alta del primo legante (freccia lunga verso destra). Il secondo equilibrio sposta l'equilibrio delle due associazioni verso destra.

c) Sono rappresentate molte molecole di P in presenza di basse concentrazioni di L. in concentrazioni di L mediamente saturanti e in concentrazioni saturanti (confrontare con d, curva 1). A qualsiasi concentrazione di L la maggior parte di molecole di P o sono libere da L o hanno L associato su ambedue le subunità. Questo perchè è più probabile che L si leghi stabilmente su una molecola di P che ha già associato un legante, piuttosto che si leghi ad una molecola di P libera, ed appena una nuova molecola di P ne associa una di legante, ne associa subito un'altra per azione dell'effetto cooperativo. Incrementando la concentrazione di L cambiano solo le quantità relative di proteina libera e complessata a due leganti. A [L] vicina allo zero, dato il grande numero di molecole di P rispetto a quelle di L, è probabile che prevalga la tendenza di associare L al maggior numero di molecole di P, tuttavia l'effetto cooperativo si instaura già a [L] molto basse, come indicato dal flesso verso l'alto della curva 1 in d.

d) Sulla ascissa [L] e sulle ordinate la percentuale dei siti della proteina oligomerica P occupati dal legante L. La concentrazione della proteina P è costante e P ha la quasi totalità (a) o la totalità (b) delle molecole con le subunità nella conformazione inattiva.

La curva di saturazione 1 è prodotta da una proteina allosterica dotata di effetto cooperativo positivo, le curve 2, 3, sono per un confronto ipotetico. La curva 2 sarebbe prodotta dalla proteina P se prima dell'aggiunta di L, tutte le subunità di tutte le sue molecole, fossero già nella conformazione attiva, per cui si comporterebbero come una proteina molto affine ad L ma non dotata di effetto cooperativo. La curva 3 sarebbe prodotta dalla proteina oligomerica P se non fosse dotata di effetto cooperativo ed ambedue le sue subunità avessero verso L una affinità costante, bassa ed uguale a quella della prima subunità della proteina della curva 1. La curva tenderebbe asintoticamente al 100% di saturazione come le proteine descritte dalle curve 1 e 2, tuttavia, mancando l'effetto cooperativo, occorrerebbero concentrazioni di L molto più alte.

Il confronto tra la curva 1 e 2 indica che una proteina con effetto cooperativo ha sempre affinità inferiore di una proteina che è già tutta nella conformazione attiva, e che a concentrazioni saturanti di legante, l'effetto cooperativo porta la quasi totalità delle molecole della proteina allosterica ad assumere la conformazione attiva ed avere quindi affinità per L identica a quella di una proteina che naturalmente è nella conformazione attiva (curva 2).

La comparazione delle tre curve mostra che la proteina dotata di effetto cooperativo (curva 1) raggiunge il 50% di saturazione a valori di [L] che sono intermedi tra quelli che saturano al 50% la proteina della curva 2 e della curva 3 (indicate con frecce sulle ascisse). Il 50% di saturazione è il punto di maggior saturazione associato alla maggiore variazione di [PL] per variazione di [L]. Si assume che la proteina dotata di effetto cooperativo sia regolata da legante a concentrazioni che sono quelle fisiologiche. Concentrazioni di L troppo basse possono essere non fisiologiche quando L deve avere una concentrazione costante

ed opportuna a reagire con altre proteine. Concentrazioni di L troppo alte possono causare reazioni di associazione non fisiologiche tra L ed altre proteine.

Le proteine 1 e 2 della figura d variano la loro saturazione dal 10% al 90% per variazioni di [L] pressochè uguali, tuttavia la proteina 2 non dotata di effetto cooperativo, ha una saturazione del 10% con [L] molto vicine allo zero.

e) Un piccolo effetto cooperativo positivo conferisce alla proteina una più efficiente regolazione perchè è richiesta una minore variazione della [L] per far variare la saturazione della proteina per valori intorno al 50% di saturazione. In figura e, sono mostrate le curve di saturazione di una proteina dotata di effetto cooperativo (1) ed una non dotata di questo effetto (2) che raggiungono il 50% di saturazione per lo stesso valore di [L]. La comparazione delle due curve mostra che la proteina dotata di effetto cooperativo (1) passa dal 10% al 90% di saturazione con una variazione di [L] che è meno della metà di quella richiesta per ottenere la stessa variazione di saturazione con la proteina (2) non dotata di effetto cooperativo positivo.

f) Una proteina dotata di un forte effetto cooperativo ha una curva di saturazione che ha le caratteristiche di un effetto soglia. La proteina passa da uno scarso valore di saturazione (10%) a quello massimo (90%) per una variazione di [L] relativamente piccola.

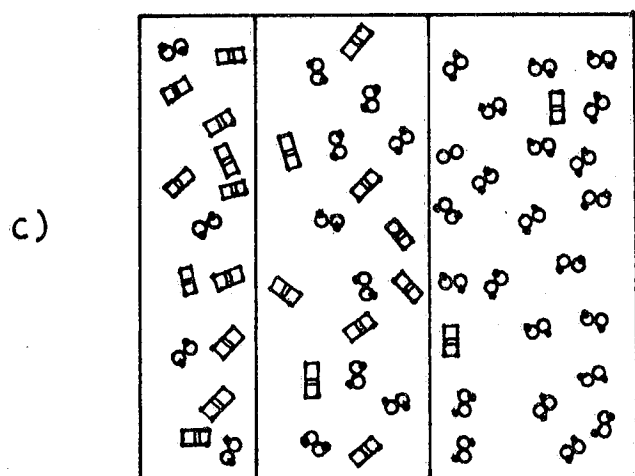
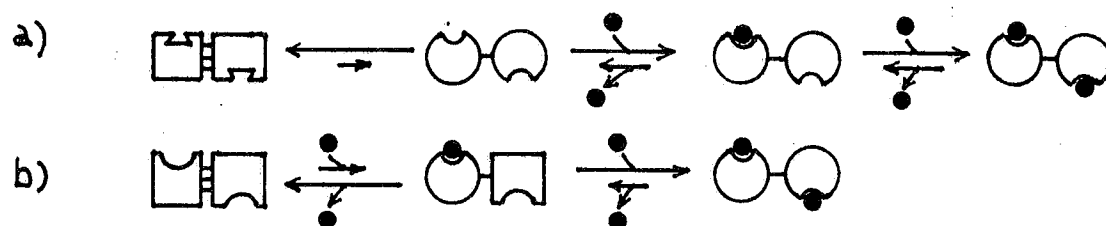
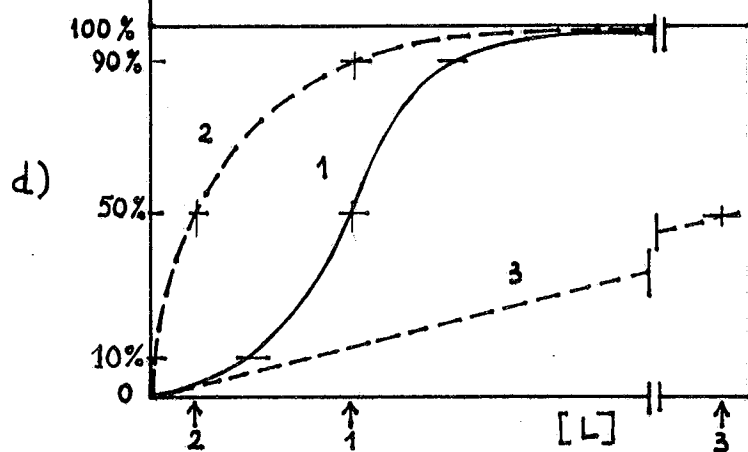


Fig. 3-7



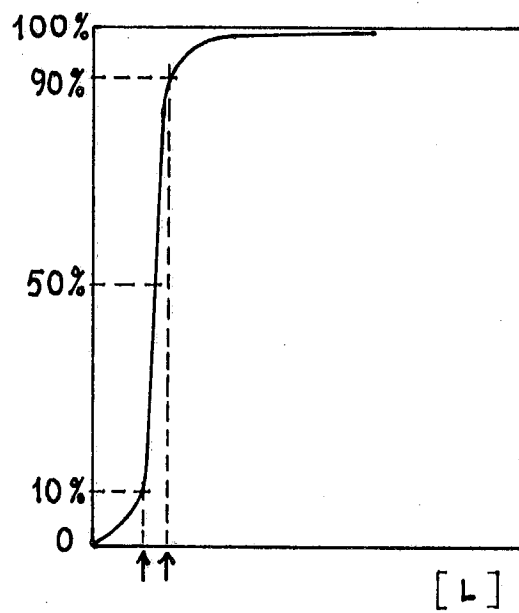
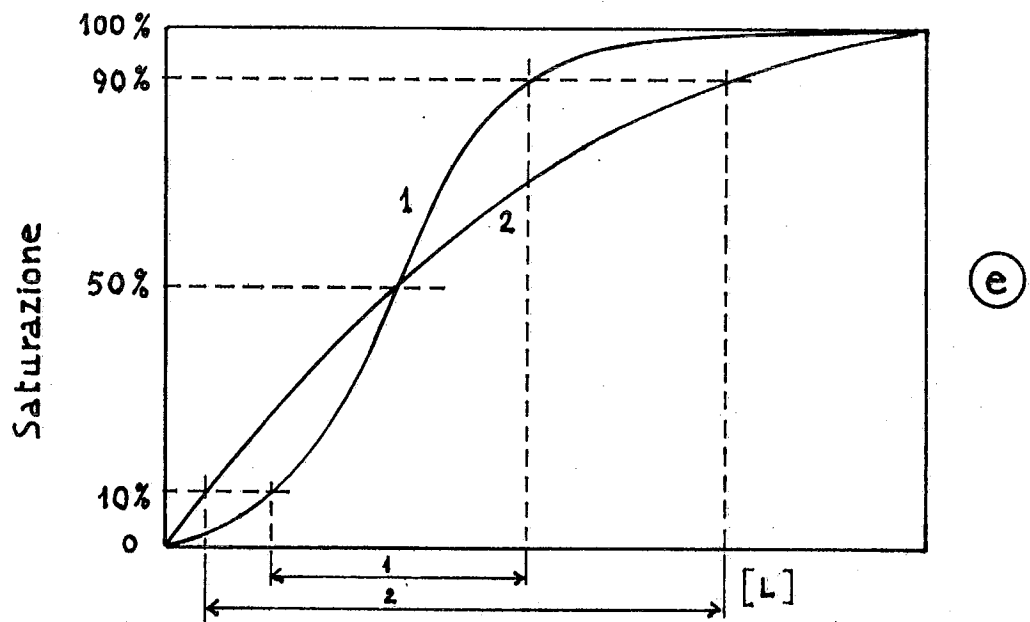


Fig. 3-7

Fig. 3-8

Meccanismo molecolare delle cooperatività positiva.

In diagonale il modello sequenziale proposto da Koshland, Nemethy e Filmer, e in verticale il modello della simmetria di conformazione (o concertato) proposto da Monod, Wyman e Changeux.

T sta per tight (o tense), ed indica la conformazione inattiva incapace di legare il legante, che è più stabile (quadrati) perchè possiede più legami quaternari (legami tra le subunità). I legami quaternari sono anche detti "costrizione quaternaria" perchè si oppongono alla transizione allosterica tra T ed R (in figura sono i trattini tra le subunità). R sta per relaxed, ed indica la conformazione attiva (cerchi) affine al legante (L). Per semplicità il legante L è indicato solo quando è legato alla proteina e non quando è libero. Le frecce sono disegnate più o meno lunghe in relazione diretta con il valore delle costanti cinetiche delle reazioni. In ambedue i modelli descritti in figura, l'ordine con cui viene l'associazione del legante alle singole subunità non è rilevante. Cioè si può legare per prima una o l'altra subunità e la cooperatività si realizza egualmente. Nel modello di simmetria di conformazione il tetramero può esistere in due sole conformazioni, T o R; non ha conformazioni ibride con una o più subunità in una conformazione e le altre nell'altra. L'equilibrio di conformazione è spostato verso la forma T (la freccia orizzontale verso sinistra è più lunga di quella verso destra) ed il legante è affine solo alla forma R, per cui la proteina deve cambiare spontaneamente conformazione prima di poter legare L. L'affinità non cambia in relazione al numero di L associati alla proteina (le frecce verticali verso l'alto hanno tutte la stessa lunghezza e sono più corte delle frecce verso il basso, anch'esse di uguale lunghezza) e le K_a delle 4 subunità sono uguali e > 1 .

Tuttavia, con l'aumentare del numero dei leganti associati alla proteina, l'equilibrio di conformazione si sposta sempre più verso destra, in relazione all'energia libera rilasciata con la formazione dei legami deboli.

Il modello di simmetria di conformazione spiega l'effetto cooperativo di proteine capaci di associare il legante anche nella conformazione T, sempre che l'affinità della forma T sia inferiore a quella della forma R.

Nel modello sequenziale, quando il legante si lega alla subunità, induce il cambiamento di conformazione nella conformazione attiva. Il primo legante è associato con scarsa affinità (la freccia verso il tetramero T è più lunga di quella verso il complesso) perchè nonostante l'interazione con il legante, la subunità preferisce tornare nella conformazione originale; il secondo legante è associato con maggiore affinità del primo perchè la seconda subunità per cambiare conformazione deve rompere meno legami quaternari, e così la seconda e la quarta subunità.

In figura, l'incremento di affinità è indicato con una riduzione della velocità di dissociazione del complesso (freccia verso l'alto), cioè con una maggiore stabilità del 2°, 3°, e 4° complesso rispetto a quello precedentemente

formato. Vediamo che le frecce nella direzione di formazione del complesso sono tutte di ugual lunghezza, indicando che la velocità di formazione del complesso è uguale per tutte le subunità, perchè tutte le subunità hanno lo stesso valore di costante di velocità di formazione del complesso; infatti interagiscono con il legante tutte nella stessa conformazione. Le frecce verso la dissociazione divengono progressivamente più corte, indicando che le costanti cinetiche divengono progressivamente più piccole perchè i complessi sono più stabili in relazione al numero di leganti associati al tetramero. Le K_a delle subunità aumentano dalla prima che si lega verso l'ultima.

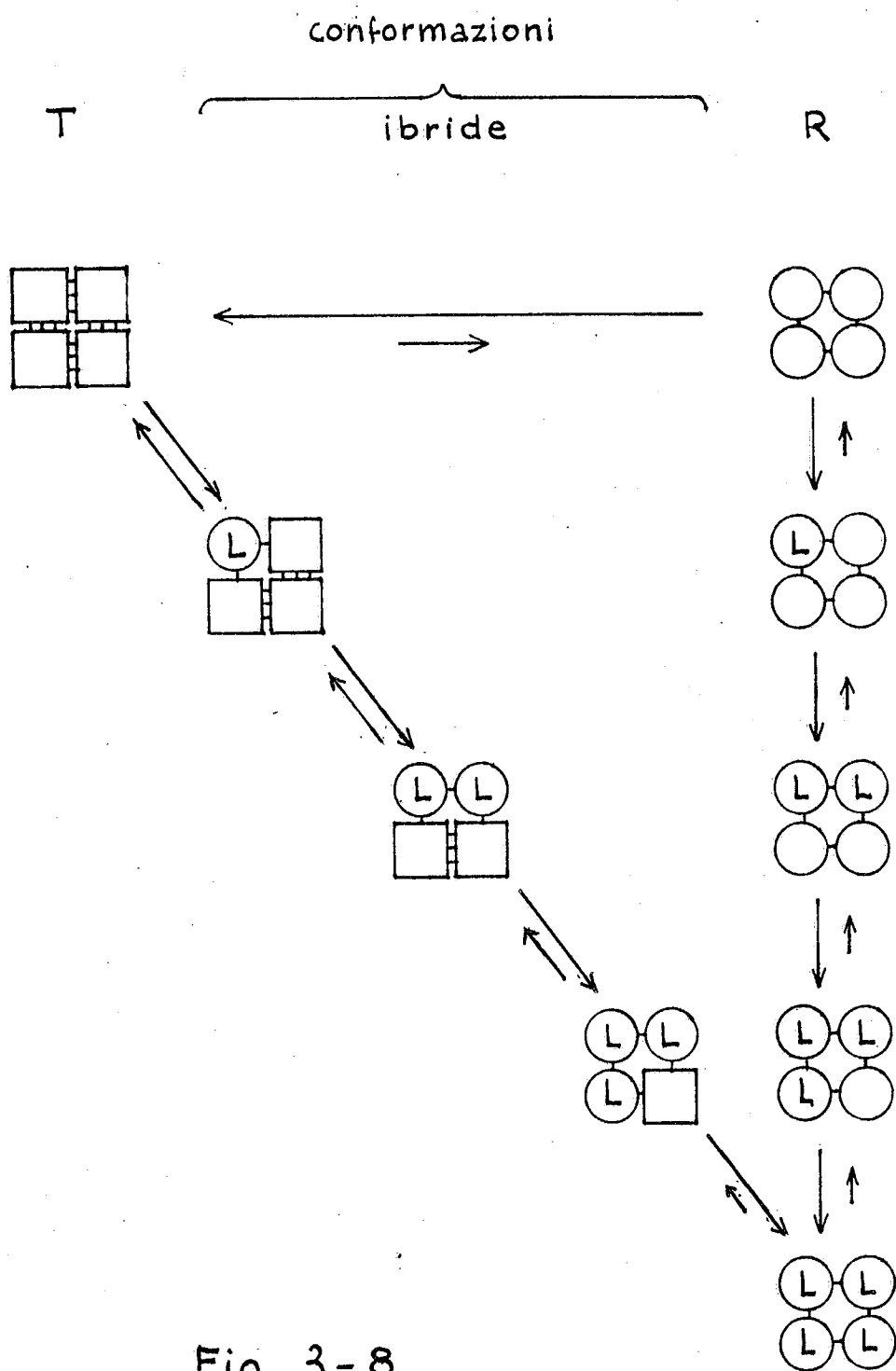


Fig. 3 - 8

Fig. 3-9

Relazioni tra interazioni quaternarie degli oligomeri, cooperatività e curve di saturazione (da Koshland, Scientific American 229, 52, 1973, modificato).

a) Una proteina oligomerica (per semplicità in figura è rappresentato un dimerico) non è necessariamente dotata di effetto cooperativo, anche se l'associazione con il legante induce un cambiamento conformazionale delle sue subunità. Se questo cambiamento non modifica i rapporti di legame tra le due subunità (interazioni quaternarie), la seconda subunità non modifica la sua affinità per il legante. In queste proteine l'affinità di una subunità è indipendente dallo stato conformazionale dell'altra. La costanza di interazioni tra le due subunità è rappresentato in figura da 3 trattini (legami deboli) che permangono tali sia che la proteina dimerica abbia o meno associato il legante. La K_a della prima associazione è >1 ed è uguale a quella della seconda. In figura è indicata da frecce uguali per le due reazioni. Le frecce verso destra sono più lunghe di quelle verso sinistra, e indicano un equilibrio spostato verso destra nelle due reazioni di associazione. La curva di saturazione di queste proteine è iperbolica.

b) Una proteina oligomerica è dotata di cooperatività positiva quando una sua subunità associa il legante, cambia conformazione e modifica le interazioni quaternarie, nel senso che i legami tra le due subunità diminuiscono di numero. La seconda subunità, pur rimanendo nella conformazione originale, ha, rispetto alla prima, maggiore affinità per il legante, perché il suo cambiamento di conformazione richiede meno energia di quella occorsa alla prima subunità. La K_a della seconda reazione di associazione è maggiore della K_a della prima, per cui il complesso che si forma è più stabile del primo. Essendo la prima reazione di associazione spostata verso sinistra e la seconda reazione spostata verso destra, si hanno le condizioni che determinano l'effetto cooperativo positivo. La maggiore spontaneità della seconda reazione favorisce la saturazione di ambedue le subunità di ogni singola molecola, e per ulteriori incrementi di [substrato], di tutte le molecole proteiche. La proteina dotata di cooperatività positiva, ha la curva di saturazione del sigmoide.

c) Una proteina oligomerica è dotata di cooperatività negativa se, quando una sua subunità associando il legante, cambia conformazione e modifica le interazioni quaternarie nel senso che i legami tra le due subunità aumentano in numero. La seconda subunità, pur rimanendo nella conformazione originale, ha, rispetto alla prima, meno affinità per il legante, perché il suo cambiamento di conformazione richiede più energia di quella necessaria per far cambiare la conformazione alla prima subunità. La K_a della prima reazione di associazione è >1 ed è maggiore della K_a della seconda reazione di associazione. L'equilibrio della prima reazione è spostato verso destra ed il secondo è meno spostato verso destra o è spostato verso

sinistra. Il primo complesso è stabile, ma è più improbabile che si formi il secondo per la caduta di affinità della seconda subunità. Il secondo complesso ha maggiore tendenza del primo a dissociarsi.

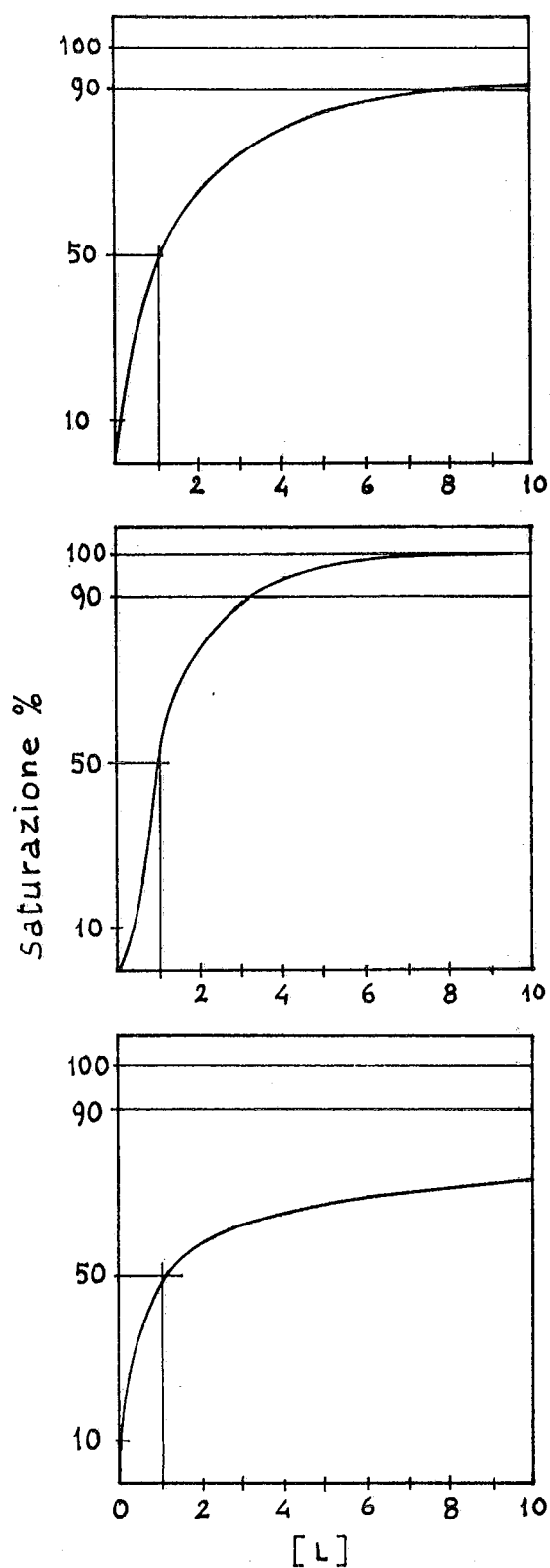
Proteina dotata di cooperatività negativa ha la curva di saturazione da legante iperbole-simile.

Le frecce verso destra dei tre tipi di proteina (a,b,c) hanno tutte la stessa lunghezza perchè la velocità di associazione si assume uguale per le due subunità, mentre le frecce verso sinistra sono più o meno lunghe perchè si assume che la regolazione dell'affinità avvenga per modulazione della stabilità del complesso. Infatti la conformazione delle subunità, prima di aver associato il legante, è assunta uguale nei tre tipi di proteina.

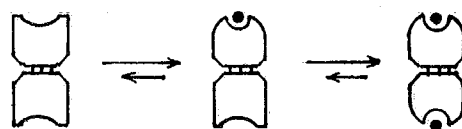
In figura è spiegata la cooperatività positiva con il modello sequenziale (e non con quello della simmetria di conformazione) al fine di poter esemplificare e comparare la cooperatività negativa (che non è spiegabile con il modello della simmetria di conformazione, vedere testo).

Le curve di saturazione sono teoriche sulla base del modello sequenziale dell'effetto cooperativo proposto da Koshland.

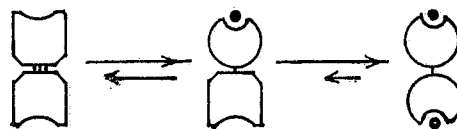
ASSOCIAZIONE DEL LEGANTE



a) SENZA COOPERATIVITA'



b) COOPERATIVITA' POSITIVA



c) COOPERATIVITA' NEGATIVA

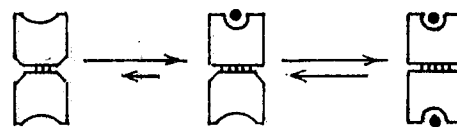


Fig. 3 - 9

Fig. 3-10

Regolazione da effettori di proteine dotate di associazione cooperativa del substrato.

a) Meccanismo molecolare di una proteina oligomerica tetramero (P) dotata di effetto cooperativo verso il substrato (L_s) e di regolazione da effettori. Il meccanismo indicato è quello della simmetria di conformazione. Ogni subunità ha un sito di legame per il substrato (detto sito attivo), uno per l'attivatore (L_A), ed uno per l'inibitore (L_I) (siti di regolazione). Attivatore ed inibitore nel senso che queste molecole fanno rispettivamente aumentare o diminuire l'attività biologica della proteina, aumentando o diminuendo la quantità di complessi P- L_s (vedere fig. b).

La proteina può esistere in due conformazioni. La conformazione biologicamente inattiva (non affine al substrato) (quadrati) ha il sito attivo ed il sito di regolazione dell'attivatore incapaci a legare i rispettivi leganti, mentre il sito di regolazione per l'inibitore è affine al suo legante. La conformazione biologicamente attiva ha il sito attivo e quello di regolazione dell'attivatore capaci di associare i rispettivi leganti, mentre il sito di legame dell'inibitore non è affine al suo legante. Quindi il cambiamento di conformazione della subunità, porta a modificazioni sia del sito attivo che di quelli di regolazione. L'equilibrio di conformazione è spostato verso la conformazione inattiva, l'inibitore (L_I) associandosi alla proteina la stabilizza ulteriormente nella conformazione inattiva spostando ulteriormente verso sinistra l'equilibrio di conformazione; ciò fa aumentare l'effetto cooperativo (vedere curva 3, di c).

L'inibitore si lega alle subunità non cooperativamente (vedere b ed e) perchè in assenza del substrato la proteina si trova prevalentemente nella conformazione inattiva. La associazione di L_I con le singole subunità di P sono indipendenti, ed anche un solo L_I per tetramero conferisce stabilità al complesso e tende a spostare verso la forma T l'equilibrio di conformazione (vedere b); con quattro leganti il complesso è ancora più stabile e l'effetto inibitorio è maggiore perchè è meno probabile che P si dissocia da L_I e ritorni attiva. Per semplicità in a) sono indicati solo i complessi P- $(L_I)_4$ e P- $(L_A)_4$. In b) sono indicate tutte le combinazioni di complessi formati dalla proteina P con il substrato e con gli effettori, assumendo che si leghino uno per volta.

L'inibitore agisce impedendo il cambiamento di conformazione di P dalla forma T a quella R che risulta in una sottrazione di molecole di P all'associazione di L_s ; tuttavia incrementando la $[L_s]$ si può rimuovere l'effetto inibitorio perchè L_s tende a spostare l'equilibrio di conformazione verso destra (vedere b).

L'attivatore stabilizza la conformazione attiva R e quindi aumenta il numero di molecole di P capaci di legare L_s . La presenza di L_A sposta l'equilibrio di conformazione verso destra riducendo l'effetto cooperativo. Se L_A è saturante P, la proteina si trova quasi esclusivamente nella conformazione attiva, per cui l'associazione cooperativa di L_s è persa e la curva di saturazione di L_s risulta

iperbolica (vedere c, curva n. 2). L_A ha una curva di saturazione sigmoidea perchè ha alta affinità e stabilizza la conformazione R di una proteina che tende a stare nella conformazione T (curva d). L_A ed L_S sono indistinguibili sotto l'aspetto dell'associazione. Su L_S la proteina esercita poi la sua azione biologica (trasporto, catalisi, ecc.). In figura per semplificare è indicato il complesso P- L_A con quattro L_A , l'associazione di L_A alle 4 subunità avviene con il meccanismo della simmetria di conformazione descritto in b.

La grande potenzialità di regolazione della formazione del complesso P- L_S operata da effettori su una proteina dotata di cooperatività positiva verso il legante substrato, è indicata in c. Se consideriamo la concentrazione di L_S indicata dalla freccia, e cioè quella che dà il 50% di saturazione di L_S in assenza di effettori, si osserva che, mantenendo questa $[L_S]$ e $[P]$ costanti, aggiungendo opportune concentrazioni di L_A e di L_I , si può far variare la quantità dei complessi P- L_S dal 1% all'85%, quindi la spontaneità di associazione tra P ed L_S è variata in una gamma di valori molto vasta. Le curve 2 e 3 sono ottenute rispettivamente in presenza di concentrazioni saturanti di L_A ed L_I . Riducendo queste concentrazioni, i rispettivi effetti (attivazione ed inibizione) sono ridotti, per cui la regolazione da effettore può essere finemente regolata. L'azione dell'effettore, e cioè la sua associazione alla proteina, non deve necessariamente precedere l'associazione del substrato, poichè, come indicato negli schemi, gli effettori ed il substrato si associano alla proteina instaurando rapidamente un equilibrio dinamico. Quindi, indipendentemente dall'ordine con cui vengono fatte le aggiunte di P, L_S , L_I ed L_A alla soluzione, la quantità di complessi P- L_S che si formeranno, dipenderà dalle quantità (concentrazioni) di P, L_S , L_I ed L_A nella soluzione e dai valori delle rispettive affinità. Quindi, se in soluzione è presente una certa concentrazione di complessi P- L_S , aggiungendo L_I essa si ridurrà ed aggiungendo L_A aumenterà molto velocemente.

b) Lo schema rappresenta tutte le combinazioni di associazione della proteina con il substrato (L_S), con un attivatore (L_A) (indicato da un piccolo cerchio), ed un inibitore (L_I) (indicato con un piccolo quadrato). Lo schema considera il caso della proteina che in conformazione T (quadrati) non ha affinità per L_S , tuttavia si avrebbe associazione cooperativa con L_S e regolazione se L_S avesse affinità anche per la forma T con valore inferiore a quella della forma R (cerchi). Risulta evidente che l'inibitore riduce il numero di molecole di proteina disponibili per l'associazione di L_S , mentre l'attivatore le fa aumentare.

f) In figura sono indicati i cambiamenti conformazionali di una proteina tetramerica simile a quella descritta in a), cioè regolata da effettori (un attivatore L_A ed un inibitore L_I) e dotata di associazione cooperativa del substrato (L_S), secondo il modello sequenziale (per semplicità non sono indicate le conformazioni ibride, vedere fig. 3-8).

La proteina nella conformazione inattiva può legare L_S , L_I ed L_A . Questa conformazione associa L_I con alta affinità non

cooperativamente; quindi l'affinità per L_I rimane costante. La stessa conformazione ha affinità per L_A . Quando L_A si lega, ad una subunità induce un cambiamento conformazionale che fa aumentare l'affinità delle subunità vicine verso L_A e verso L_S . L_A è associato cooperativamente come il substrato L_S .

L_I è inibitore della formazione dei complessi proteina-substrato ($P-L_S$) perchè stabilizza la conformazione inattiva rendendo energeticamente più sfavorevoli i cambiamenti di conformazione indotti da L_S ed L_A . L_A è attivatore perchè induce gli stessi cambiamenti di conformazione che induce L_S , quindi in presenza dell'attivatore L_A sarà presente una quantità maggiore di molecole proteiche con una o più subunità nella conformazione attiva, cioè dotate di alta affinità verso il substrato.

Per gli altri aspetti, curve di saturazione, regolazione, ed altre considerazioni, la proteina è identica a quella descritta in a, b, c).

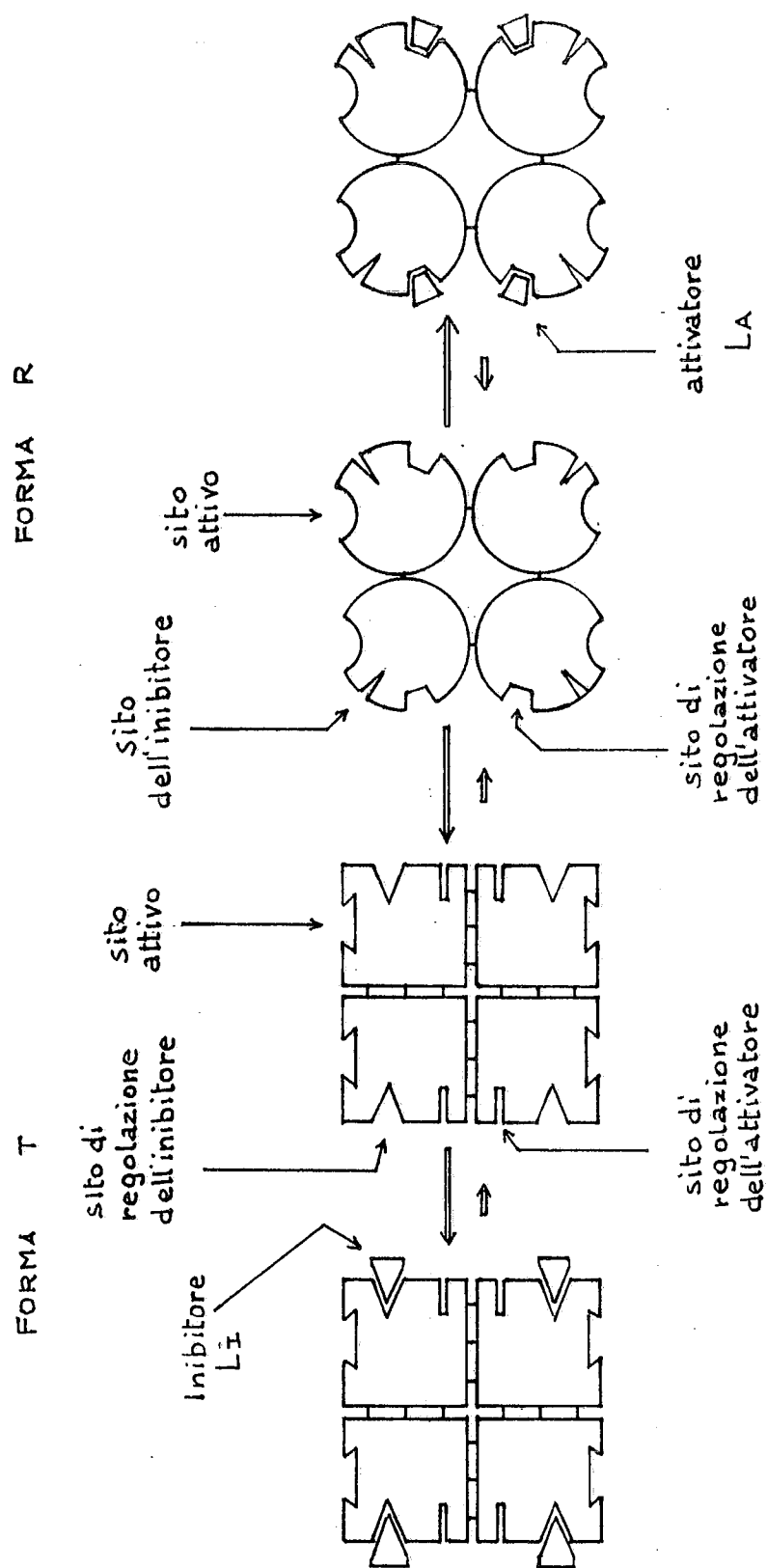


Fig. 3-10 a

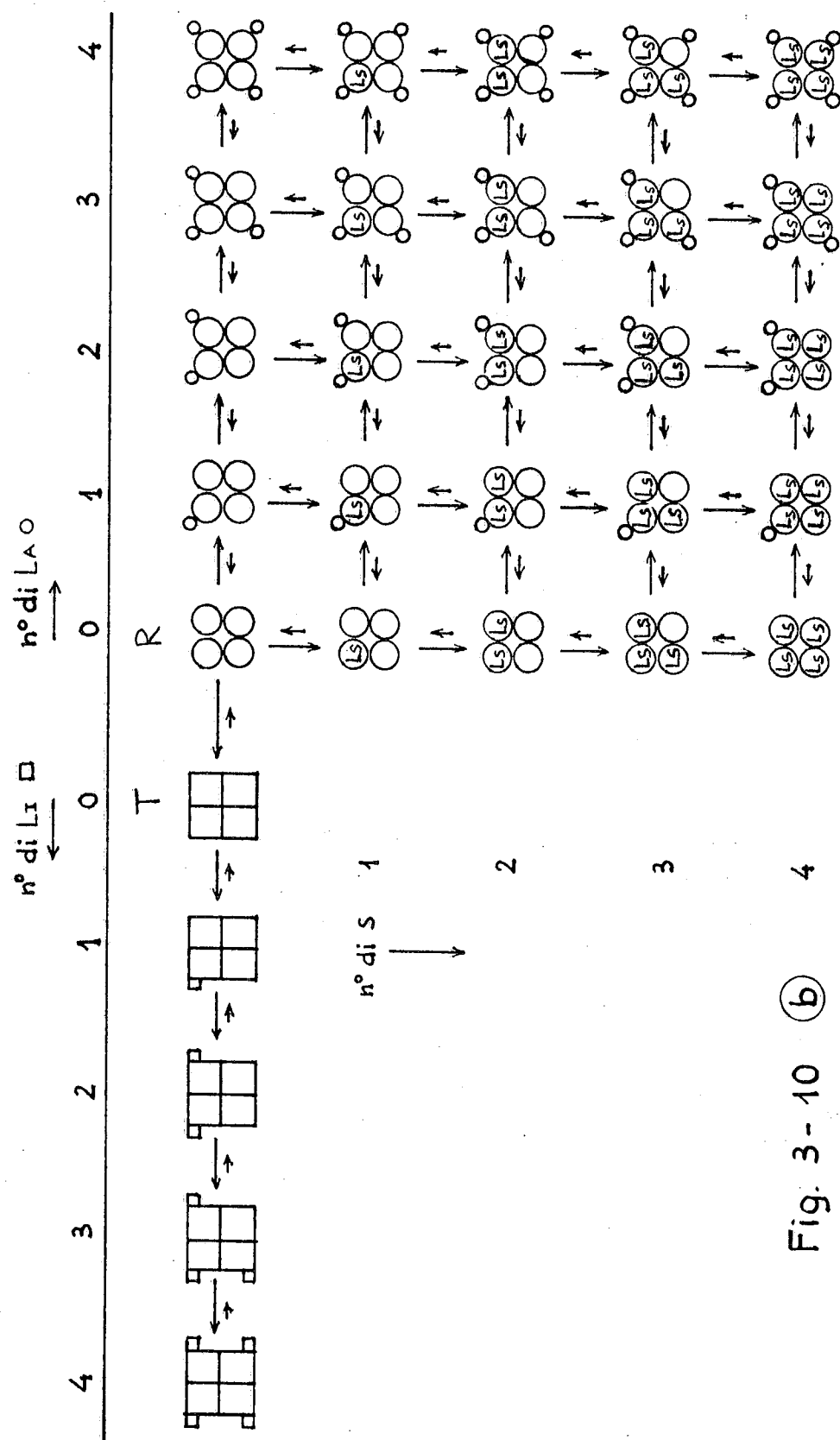
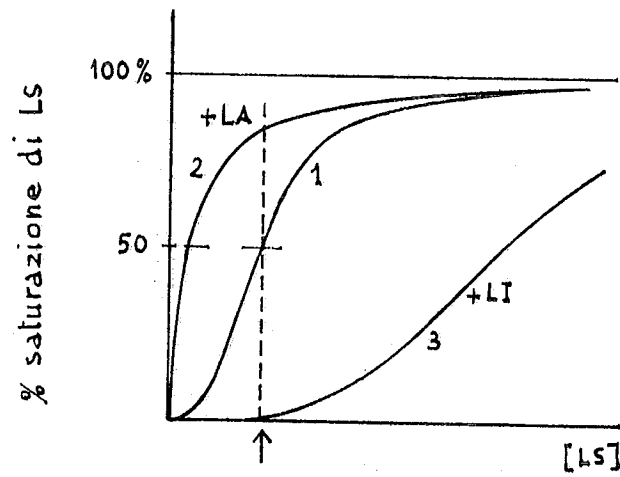


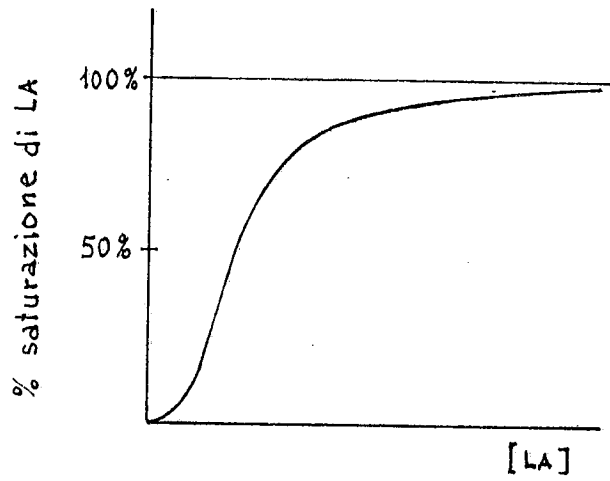
Fig. 3-10 (b)

Fig. 3-10

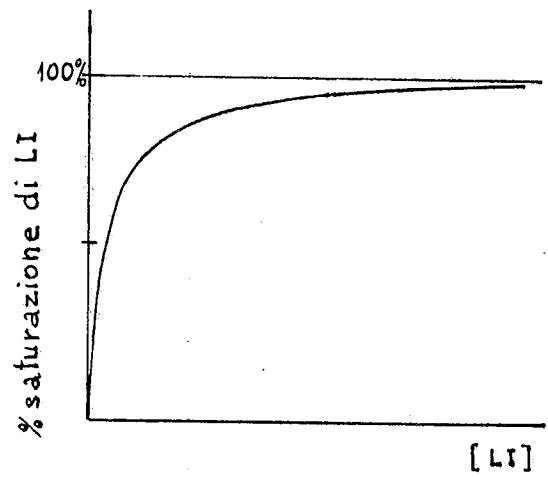
(c)



(d)



(e)



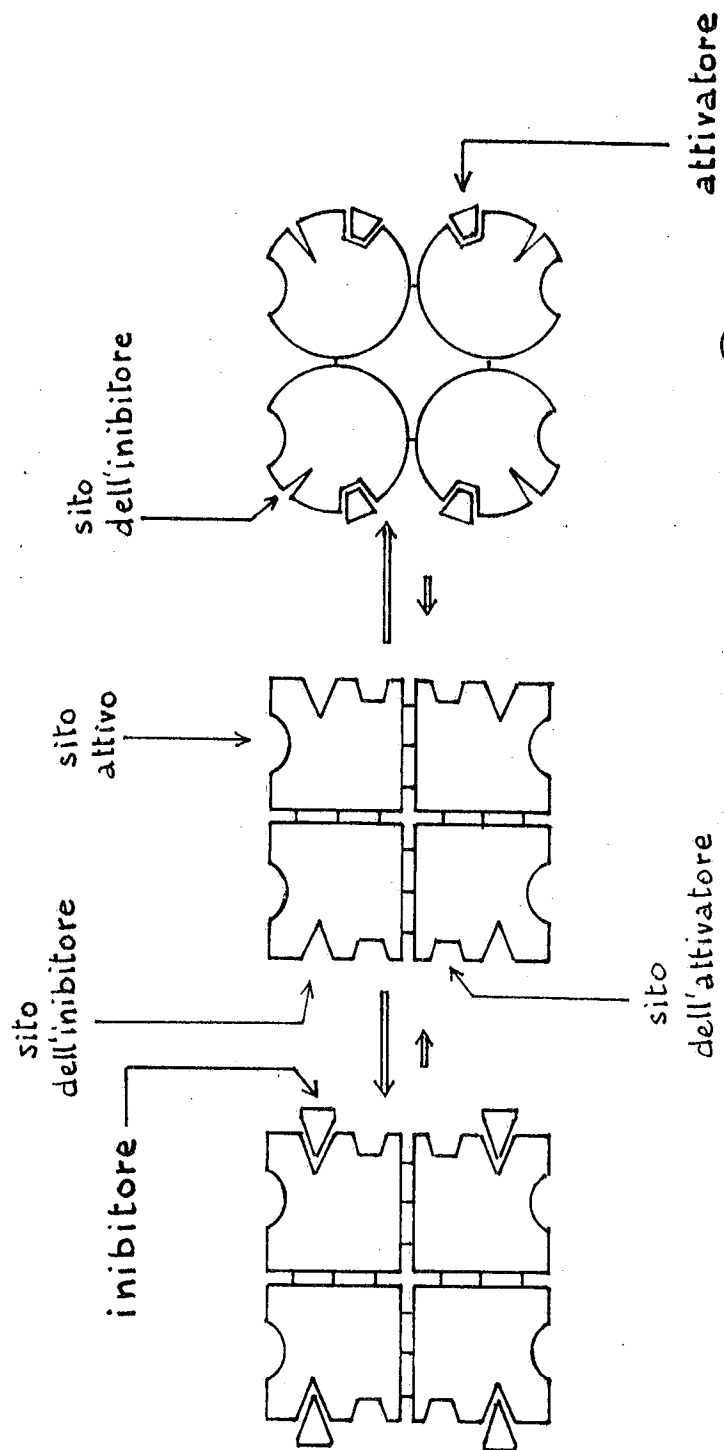


Fig. 3-10 (f)

Fig. 3-11

Curve di saturazione da substrato (L_s) di una proteina non regolata.

a)

Curva n. 1. solo substrato (L_s)

Curva n. 2. in presenza di un inibitore non fisiologico (I-nf).

L'inibitore non fisiologico può agire nel sito di legame o sulla superficie della proteina, viene comunque rimosso da incrementi di L_s e si comporta quindi come inibitore competitivo, perchè in ambedue i casi la presenza di L_s esclude quella di I-nf e viceversa.

Curva n. 3. in presenza di attivatore non fisiologico (A-nf).

A-nf rende la proteina più affine ad L_s e quindi a parità di $[L_s]$ si formeranno più complessi P- L_s quando A-nf è presente e la $[L_s]$ non è saturante. A $[L_s]$ saturanti l'azione di A-nf è persa perchè L_s è comunque associato alla totalità della molecola di P (curve 1 e 3).

b)

L'I-nf, analogo di L_s , si lega reversibilmente al sito di legame della proteina, ed è quindi un inibitore competitivo puro.

c)

L'I-nf si lega reversibilmente alla superficie della proteina che cambia conformazione e modifica il sito di legame rendendolo meno o non affine al substrato.

d)

L'A-nf si lega reversibilmente alla superficie della proteina che cambia conformazione e modifica il sito di legame rendendolo più affine al L_s (in figura il sito più affine è indicato come una forma più combaciante con quella di L_s).

Per ulteriori spiegazioni vedere il testo a pag.131.

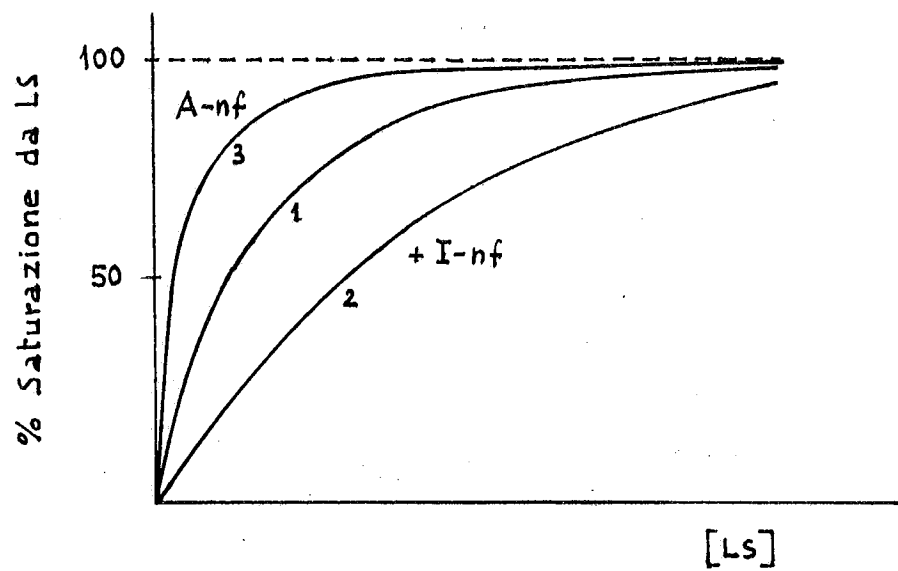
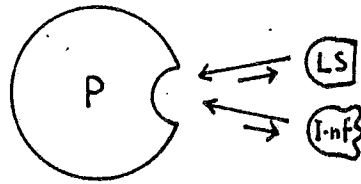
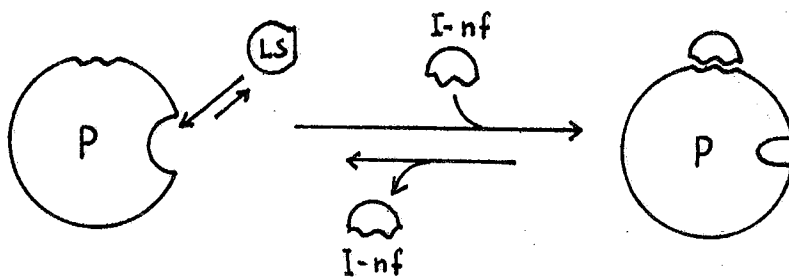


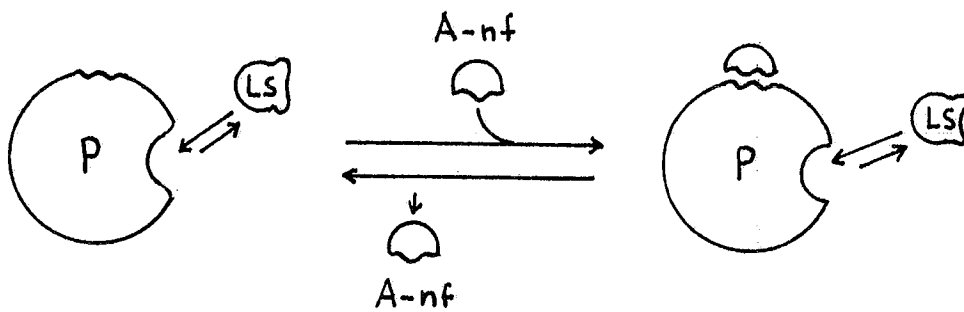
Fig. 3-11 (a)



(b)



(c)



(d)

Fig. 3-11

CAPITOLO 4

Proteine dotate di attività biologica oltre quella di associare leganti.

Nei capitoli precedenti sono state descritte proteine la cui proprietà biologica consisteva nell'associare reversibilmente e specificamente un legante substrato e di proteine regolate, la cui associazione del legante substrato poteva essere regolata da leganti effettori. Queste proteine esistono in natura e svolgono funzioni di deposito o di trasporto di una molecola e di uno ione monoatomico.

La mioglobina è la molecola che permette un deposito di O_2 nelle fibre muscolari, la ferritina del Fe^{3+} in vari organi. Nel sangue l'albumina trasporta acidi grassi ed altre molecole, l'emoglobina trasporta O_2 e la transferrina il Fe^{3+} . Fra queste proteine l'emoglobina è una proteina regolata da effettore.

In natura esistono moltissime proteine la cui funzione biologica non è solo nell'associare il substrato, ma ciò è solo la prima fase di un evento che caratterizza la funzione biologica.

Per queste proteine si parla di riconoscimento molecolare per la prima fase (associazione reversibile specifica del substrato) e di attività biologica specifica per la seconda fase che avviene per azione della stessa molecola proteica. Con "attività biologica" si intendono genericamente ambedue gli eventi.

Gli enzimi sono proteine che associano specificamente il substrato(i) e catalizzano specificamente una reazione, per cui il substrato(i) si dissocia dall'enzima come un composto diverso, prodotto(i).

I recettori degli ormoni associano la molecola dell'ormone e trasmettono (trasduzione) il segnale dell'avvenuta associazione dell'ormone ad un'altra macromolecola od a strutture sopramolecolari, in modo da portare all'interno della cellula un segnale proveniente per via circolatoria da altre cellule.

Regolazione dell'attività biologica di proteine dotate di altra attività oltre quella di associare il legante.

Le proteine dotate della sola capacità di associare il substrato, possono essere regolate solo rendendole più o meno affini al substrato stesso. Quindi la trattazione dei capitoli precedenti è la trattazione della regolazione delle proteine di deposito e di trasporto.

Le proteine che oltre alla capacità di associare il substrato (i) sono anche dotate di un'altra attività,

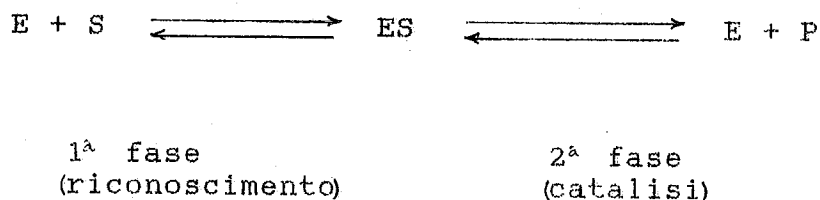
possono essere regolate nella loro attività biologica in due modi diversi:

a) per modulazione dell'affinità che la proteina ha verso il primo(i) substrato(i), che può essere operata mediante un effetto cooperativo, per azione di effettori e per azione di modificazioni covalenti;

b) per modulazione dell'attività biologica specifica, cioè dell'evento successivo all'associazione del substrato, che, in linea teorica, può essere operato per azione di effettori o modificazioni covalenti, e mediante l'effetto cooperativo da legante substrato, quando oltre alla variazione dell'affinità, la cooperatività causi variazioni dell'attività biologica specifica.

Regolazione dell'attività catalitica degli enzimi.

Gli enzimi sono una classe di proteine la cui attività biologica è stata molto studiata a livello molecolare, e la loro regolazione viene presa come modello per alcune generalizzazioni. Gli enzimi formano reversibilmente un complesso con i propri substrati (S), successivamente il complesso si dissocia in enzima e prodotti (P) liberi. I substrati di un enzima sono in genere due perchè le reazioni cellulari sono per lo più bimolecolari. Tuttavia per semplicità viene usato lo schema seguente, che inoltre assume che la trasformazione di ES in E + P avvenga in un unico passaggio, mentre sono in genere più di uno.



La velocità di una reazione catalizzata dipende dalla velocità con cui avvengono le due fasi. La velocità con cui si forma il complesso ES dipende dalla concentrazione di E e di S. Se la concentrazione di E è costante, la velocità con cui si forma il complesso ES dipende dalla concentrazione di S. Aumentando la concentrazione di S aumenterà il numero di complessi che si formano nell'unità di tempo e quindi aumenterà anche la velocità della reazione catalizzata. In genere la velocità con cui si forma ES è molto più alta di quella con cui viene trasformato E + P, per cui la [ES] rimane costante se [S] rimane costante e P è rimosso continuamente. La [ES] è detta concentrazione allo stato stazionario (C_{ss}) perchè, pur essendo costante in valore, non risulta da una reazione all'equilibrio termodinamico, ma dalla combinazione della velocità di formazione di ES, della sua dissociazione e della trasformazione di ES in EP.

Regolazione da effettori della velocità di reazione catalizzata da enzima per variazione dell'affinità dell'enzima verso il substrato.

L'attività catalitica di molti enzimi è regolata da effettori che modulano l'affinità dell'enzima verso il substrato. Variando l'affinità si fa variare la spontaneità della prima reazione (1 fase), quindi la concentrazione allo stato stazionario dei complessi ES, quindi il numero dei complessi ES che evolverà in E + P (2 fase).

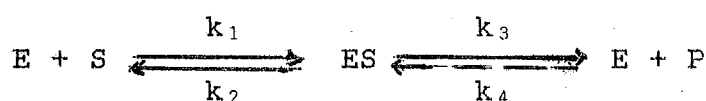
Regolando l'affinità dell'enzima verso il substrato si regola l'attività catalitica dell'enzima e quindi la velocità della reazione catalizzata. Se i substrati sono due è sufficiente che sia variata l'affinità verso uno di questi perchè venga variata la velocità di catalisi.

L'affinità dell'enzima verso S può essere variata variando la k_1 e/o la k_2 .

Se accettiamo che la formazione del complesso enzima-substrato sia identica a quella di una proteina non dotata di catalisi, la curva di saturazione di un enzima in relazione al substrato è del tutto identica a quelle delle proteine non regolate (fig. 2-1), e se è un enzima regolato a quella delle proteine regolate (fig. 3-3, 3-6). Tuttavia può essere difficile misurare la concentrazione di ES perchè l'enzima che associa il substrato la converte rapidamente in prodotti, per cui nello studio delle proprietà di regolazione di un enzima viene utilizzata la velocità della reazione catalizzata che è in relazione alla C_{ss}-ES.

La reazione di formazione del complesso ES e quella della sua dissociazione in E + P sono ambedue reversibili e per convenienza la velocità della reazione è misurata in condizioni di velocità iniziale (V_i), cioè in condizioni in cui l'enzima è posto in presenza del substrato e la velocità della reazione catalizzata (scomparsa del substrato) è misurata prima che si siano formate tante molecole di prodotto da promuovere significativamente la formazione di ES da E e P.

In condizioni di velocità iniziale con le semplificazioni sopra indicate, la V_i è in relazione diretta alla [ES]



$$V_i = [ES] K_3$$

$$V_{max} = [E_t S] K_3$$

La velocità massima V_{max} è la velocità dell'enzima saturo di substrato, cioè quando tutte le molecole di enzima (E_t) sono associate ad S, ed appena P si dissocia da E, in tempi brevissimi un'altra molecola di S si associa all'enzima. La curva della V_i in funzione della [S] di un enzima non regolato è iperbolica ed è il diagramma della formula di Michaelis e Menten che pone in relazione la V_i con la [S].

$$V_i = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

La K_m include le costanti cinetiche delle tre reazioni che operano in condizioni di V_i . La $[S]$ che ha il valore della K_m conferisce alla reazione catalizzata una velocità uguale ad $\frac{1}{2} V_{\max}$.

$$V_i = \frac{V_{\max} - K_m}{2K_m} = \frac{V_{\max}}{2}$$

Gli enzimi non regolati hanno la curva di V_i in funzione di $[S]$ iperbolica (fig. 4-1a), quelli dotati di cooperatività positiva verso il substrato, hanno la curva sigmoide (fig. 4-1b) e quelli dotati di cooperatività negativa hanno curva iperbole simile (4-1c). Gli effettori che regolano l'attività catalitica degli enzimi regolati modificando l'affinità dell'enzima verso il substrato, modificano la curva di $V_i/[S]$ nella stessa maniera in cui gli effettori modificano le curve di saturazione delle proteine non dotate di catalisi (vedere figg. 4-2, 4-3).

Anche per la regolazione degli enzimi valgono le considerazioni fatte per la regolazione delle proteine dotate della sola proprietà di legare il substrato (vedere Cap. 3) qui riassunte:

1) il punto di massima regolazione (regolazione amplificata, veloce) dell'attività catalitica di un enzima, sia esso non regolato o regolato, è per valori di $[S]$ che danno valori di $V_i = \frac{1}{2} V_{\max}$. Per gli enzimi non regolati questo valore è uguale a quello della K_m .

2) un enzima dotato di effetto cooperativo moderato ha una regolazione dell'attività catalitica per variazione della $[S]$ più efficiente di un enzima non regolato o regolato con cooperatività negativa (figg. 3-9÷3-10). Per far variare la V_i da 1/10 a 9/10 della V_{\max} (equivalente ad una variazione dell'80% della V_{\max}) occorre variare la concentrazione del substrato di 81 volte per l'enzima non regolato, di 9 volte per l'enzima dotato di cooperatività positiva per il substrato e di 6541 volte per l'enzima dotato di cooperatività negativa (vedere fig. 4-1);

3) l'effetto cooperativo positivo permette di avere valori di V_i relativamente bassi con concentrazioni di $[S]$ relativamente alte (fig. 4-2, curva 1, freccia 5). Queste $[S]$ sono molto più alte di quelle occorrenti ad un enzima, non dotato di effetto cooperativo, per raggiungere gli stessi bassi valori di V_i (confrontare curva 1 e 2 di fig. 4-2).

Questa proprietà trova una spiegazione considerando che i metaboliti cellulari partecipano a più reazioni e che le loro concentrazioni subiscono oscillazioni, ma normalmente non vengono mai annullate. Così con variazioni relativamente

piccole di concentrazione di un metabolita substrato, di un enzima dotato di effetto cooperativo e di un enzima non dotato di tale effetto, risulterà che la velocità di catalisi del primo enzima subirà forti variazioni, mentre quella del secondo rimarrà ad alti valori;

4) la velocità iniziale di una reazione catalizzata da un enzima dotato di cooperatività positiva e di regolazione da un effettore positivo e da uno negativo, può essere variata da valori vicino allo zero a valori vicini a quelli massimi senza variare la concentrazione del substrato, nè quella della proteina, ma solo variando le concentrazioni degli effettori (fig. 4-2, freccia 5 e fig. 4-3).

Regolazione da effettori della velocità di reazione catalizzata da enzima per variazione della velocità intrinseca di catalisi.

La velocità intrinseca di catalisi è la velocità con cui il complesso ES è convertito in E + P, cioè la velocità della seconda fase di tutto il processo di catalisi enzimatica (vedere pag. 84).

In condizioni di velocità iniziale la velocità intrinseca di catalisi è:

$$V_i = [ES] k_3$$

k_3 è anche definita come costante catalitica o numero di turnover, cioè il numero di catalisi operate da una molecola (o mole) di enzima per unità di tempo. Il numero di turnover si ottiene sperimentalmente dividendo il numero di molecole di substrato trasformate in prodotti nell'unità di tempo per il numero di molecole di enzima dosato in condizioni di V_{max} , cioè con E saturato dal rispettivo substrato(i). Il numero di turnover è una costante dell'enzima ed è tale anche in condizioni di V_i diverse da V_{max} , tuttavia la misura del numero di turnover viene fatta in V_{max} perchè $[ES]$ è uguale a E_t , cioè si conosce il numero delle molecole di E impegnate nella catalisi.

Il numero di turnover può variare molto da enzima ad enzima. L'anidrasi carbonica ha numero di turnover = 600.000 trasformazioni al secondo e la fosfoglucomutasi circa 21 trasformazioni al secondo.

Se assumiamo che la concentrazione allo stato stazionario di ES sia costante la V_i può essere variata variando la k_3 .

$[ES]$ allo stato stazionario è costante quando k_3 è piccolo rispetto a k_1 , così la quantità di ES trasformata in E + P è relativamente piccola e viene rapidamente riformata da E ed S liberi. In genere $k_3 < k_1$, ma esistono alcuni enzimi in cui i valori delle due costanti sono comparabili. Comunque anche per questi enzimi la regolazione della k_3 è possibile ed influenza la V_i di reazione.

Il meccanismo molecolare tramite il quale la k_3 può essere diminuita o aumentata senza alterare i valori della k_1 e/o della k_2 , è un cambiamento di conformazione della proteina che modifichi le posizioni dei residui aminoacidici responsabili della catalisi e/o di gruppi all'interno della molecola proteica coinvolti nei cambiamenti di conformazione richiesti per realizzare la catalisi. Questi cambiamenti di conformazione possono rendere energeticamente più o meno

costosi i meccanismi responsabili della catalisi (adattamento indotto, effetto prossimità ed orientamento, distorsione del substrato). Questo stesso cambiamento conformazionale non altera le posizioni relative dei residui aminoacidici responsabili della formazione del complesso enzima-substrato e quindi non altera l'affinità dell'enzima verso il substrato. Il substrato si legherà con la stessa affinità alla molecola dell'enzima sia nella conformazione cataliticamente attiva che nella conformazione meno o non attiva, per cui questo tipo di enzima regolato ha una curva di saturazione da substrato iperbolica, e saranno quindi iperboliche anche le curve di saturazione da substrato in presenza degli effettori positivi e negativi (vedere fig. 4-3). Sebbene si possa legare alla conformazione inattiva il substrato non subisce la catalisi, non è trasformato in prodotti o ciò avviene molto più lentamente di quando il substrato è associato allo stesso enzima nella conformazione attiva.

L'incremento della concentrazione del substrato non potrà rimuovere l'inibizione operata dall'effettore poichè, avendo il substrato la stessa affinità per le due conformazioni della proteina enzimatica, non può influire sull'equilibrio delle due conformazioni che è influenzato solamente dagli effettori. Risulta così che, in questo tipo di enzimi, a differenza degli enzimi regolati per variazione della loro affinità verso il substrato, il valore della V_{max} varia in relazione alla presenza degli effettori. In presenza di [inibitore] e di [attivatore] corrispondono rispettivamente ad una riduzione e ad un aumento costante della concentrazione di molecole di enzima cataliticamente attive. L'attività catalitica residua osservata in fig. 4-3a, curva 3, può essere spiegata in due modi estremi:

- a) essa rappresenta l'attività di molecole di enzima nella conformazione attiva che l'inibitore, presente in concentrazioni non saturanti, non ha convertito nella conformazione inattiva. Nella conformazione inattiva, l'enzima è completamente inattivo ($K_3 = 0$) per cui il minor valore della V_{max} rispetto alla V_{max} è dato dal minor numero minore di molecole impegnate nella catalisi, la cui k_3 non è cambiata perchè non hanno associato l'inibitore;
- b) anche nella conformazione inattiva la singola molecola di enzima ha una attività catalitica residua che è molto inferiore a quella della stessa molecola nella conformazione attiva. In questo caso l'attività catalitica residua può essere data da tutte le molecole di enzima, che pur avendo associato l'inibitore, operano la catalisi ma con minore velocità rispetto alle stesse molecole nella conformazione attiva. In questo caso il cambiamento di conformazione riduce il valore della k_3 ma non l'annulla e la V_{max} rappresenta l'attività di tutte le molecole di enzima nella conformazione meno attiva. Possono esistere enzimi in cui ambedue i meccanismi siano responsabili dell'attività residua. Il problema di conoscere le cause dell'attività catalitica residua può essere risolto controllando accuratamente lo stato di saturazione dell'enzima da parte dell'inibitore. Quando la quasi totalità (>99,9%) delle molecole di enzima è complessata con l'inibitore, se si osserva una attività catalitica inferiore al 1/1000,

l'enzima è di tipo a), se è superiore l'enzima è di tipo b) o misto (di ambedue i tipi).
 Le considerazioni fatte sull'attività residua possono essere fatte anche sull'incremento di attività osservato in presenza di un attivatore (curva 2 di fig. 4-3a).
 L'attività dell'enzima è finemente regolata facendo variare le concentrazioni degli inibitori senza variare la concentrazione del substrato (fig. 4-3). Lo spettro di variazione della V_i è inferiore a quello degli enzimi dotati di cooperatività positiva verso il substrato (vedere fig. 4-2); tuttavia questo tipo di regolazione non deve essere considerato come meno adatto a regolare una via metabolica, esso è in relazione alla funzione svolta dall'enzima nel metabolismo cellulare.
 La regolazione della velocità intrinseca di catalisi può essere spiegata anche assumendo che l'enzima sia monomero (vedere fig. 4-3c), tuttavia come precedentemente indicato, gli enzimi regolati fino ad ora analizzati sono di natura oligomerica. Una spiegazione è nella constatazione che tali enzimi sono in genere dotati di associazione cooperativa del substrato e/o degli effettori, e l'associazione cooperativa è possibile solo su oligomeri.

Alcune considerazioni sulla regolazione da effettori degli enzimi.

La regolazione dell'affinità (da effettore e cooperatività) e della attività intrinseca di catalisi di un enzima sono i due tipi di meccanismo con i quali si può regolare un enzima. Questi due meccanismi di regolazione possono coesistere su uno stesso enzima. Le curve di saturazione da substrato in assenza e presenza di effettori risulteranno sigmoidi (iperbolica quando l'attivatore è saturante) e le V_{max} raggiunte hanno tra loro valori diversi. Inoltre esistono in natura enzimi dotati di meccanismi di regolazione che non corrispondono a nessuno dei modelli proposti (vedere fig. 4-4). Questi dati confermano le considerazioni precedentemente fatte (cap. 3) che i meccanismi di regolazione delle proteine siano molto eterogenei e diversi da proteina a proteina in relazione al tipo di funzione e di struttura della proteina regolata ed al cammino evolutivo percorso dalla proteina.

Regolazione della attività catalitica degli enzimi mediante modificazioni covalenti.

Molti enzimi sono regolati mediante una o più reazioni covalenti di esterificazione dei propri residui di serina con acido fosforico (fosforilazione). Le reazioni sono catalizzate da enzimi proteina-cinasi, il donatore del gruppo fosforico è l'ATP.
 Le proteine-cinasi sono altamente specifiche ed agiscono su un unico enzima su più specie molecolari di enzima appartenenti a vie metaboliche diverse che devono funzionare nella stessa condizione metabolica. Gli enzimi fosforilati sono defosforilati con reazioni di idrolisi del legame estereo catalizzate da enzimi proteina fosfatasi specifiche per un enzima o per gruppi di enzimi.

L'enzima regolato mediante fosforilazione esiste in due conformazioni stabili diverse, una delle quali ha scarsa o non ha attività catalitica, mentre l'altra è cataliticamente attiva. Una delle due conformazioni è indotta e stabilizzata mediante fosforilazione ed in relazione all'enzima può essere quella cataliticamente attiva o quella inattiva. L'analisi comparativa degli enzimi regolati mediante fosforilazione-defosforilazione, indica che la fosforilazione attiva gli enzimi coinvolti nel catabolismo aerobico ed anaerobico delle riserve energetiche (glicogeno, trigliceridi). Gli stessi enzimi sono inibiti con la defosforilazione. La fosforilazione inibisce gli enzimi delle vie metaboliche di sintesi (del glicogeno, degli acidi grassi, dei trigliceridi) e della piruvato cinasi e della piruvato deidrogenasi epatiche (vedere fig. 7-9). L'attività di molte proteina cinasi e di alcune proteina fosfatasi è sotto controllo ormonale. Le proteina cinasi controllate da ormoni sono attivate allostericamente dal cAMP (messaggero intracellulare di molti ormoni) o per fosforilazione catalizzata da cinasi attivate direttamente da cAMP (vedere fig. 7-9). Alcuni enzimi regolati mediante fosforilazione-defosforilazione, nella loro forma cataliticamente meno attiva che può essere, a seconda dell'enzima, la forma fosforilata o quella non fosforilata, sono sensibili ad effettori allosterici positivi e negativi (fig. 7-9). La doppia regolazione (da fosforilazione e da effettori) di un enzima, ha suggerito alcune ipotesi sui meccanismi di regolazione delle vie metaboliche. In particolare le forme enzimatiche attivate dall'azione degli ormoni (siano fosforilate o defosforilate), sono insensibili agli effettori suggerendo che i segnali di regolazione provenienti dall'esterno della cellula (ormoni) possono prevalere sui segnali interni (effettori) perchè i cambiamenti conformazionali della molecola enzimatica, provocati dalla fosforilazione o defosforilazione, non solo regolano l'enzima, ma lo rendono anche insensibile agli effettori (vedere cap. 4 e fig. 7-9). I cambiamenti conformazionali provocati dalla fosforilazione possono far variare l'attività catalitica dell'enzima per variazione dell'affinità verso i substrati e/o per variazione dell'attività intrinseca di catalisi. I due differenti meccanismi non possono essere evidenziati da curve della V_i in funzione della concentrazione del substrato, come visto per l'azione degli effettori (figg. 4-2, 4-3), la [substrato] non può influire sull'equilibrio di conformazione (fig. 4-6). Supponiamo che il substrato (o un effettore) abbia affinità solo per l'enzima fosforilato e che stabilizzi ulteriormente tale conformazione. Anche se la [S] viene aumentata in modo tale da poter saturare tutte le molecole di enzima (fosforilate e non), il substrato si legherà solo alle molecole fosforilate per le quali ha affinità, ed anche se stabilizza la conformazione fosforilata non può modificare l'equilibrio tra le due conformazioni perchè stabilito nelle quantità relative di molecole di enzima fosforilate e non fosforilate. Queste quantità dipendono dalle attività relative degli enzimi proteina cinasi e proteina fosfatasi.

Le due forme enzimatiche, fosforilata e non fosforilata, sono convertite continuamente l'una nell'altra al fine di rendere il processo rapidamente reversibile. Un enzima regolato mediante reazioni covalenti ha una curva di saturazione iperbolica che raggiunge il valore di V_{max} in relazione alle quantità relative delle due forme di enzima (fosforilato e non-fosforilato), sia che le due forme di enzima abbiano valori diversi di attività catalitica, perchè hanno affinità diverse per il substrato, o perchè hanno attività intrinseca di catalisi diversa (fig. 4-6).

Attivazione irreversibile degli enzimi mediante reazioni covalenti.

L'attivazione irreversibile mediante reazioni covalenti avviene in genere mediante l'azione di una proteasi che scinde un legame peptidico liberando un peptide di pochi aminoacidi. La perdita del peptide fa cambiare conformazione e/o demaschera il sito attivo della proteina che diviene biologicamente attiva. Si parla di attivazione irreversibile e non di regolazione perchè la regolazione per definizione è reversibile. Enzimi digestivi, ormoni, proteine di trasporto, subiscono questo tipo di attivazione quando sono esportati dalla cellula, al fine di evitare che la proteina conservata nella cellula di sintesi svolga la sua azione nella cellula stessa.

Inibizione reversibile di enzimi non regolati.

Gli enzimi non regolati possono subire interferenze nella loro attività di catalisi da parte di molecole che si legano al sito catalitico od in altre parti della loro superficie. Non si può parlare in questi casi di regolazione perchè l'effetto sull'enzima non è naturale nel senso che l'incontro tra enzima ed inibitore normalmente non avviene. esso risulta dall'azione diretta od indiretta nell'uomo (es. farmaci, veleni, agenti inquinanti, conservanti). Comunque avvenga l'azione di questi composti non ha un ruolo fisiologico. Questi composti possono essere prodotti di sintesi operate dall'uomo o prodotti naturali di origine vegetale od animale.

Inibizione competitiva.

L'inibizione competitiva pura di un enzima è causata da composti strutturalmente simili al substrato, detti analoghi del substrato, i quali possono associarsi reversibilmente all'enzima nel sito catalitico, ma non subiscono la reazione catalizzata dall'enzima perchè la loro struttura non permette l'instaurarsi dell'induced-fit o comunque una corretta interazione con i residui aminoacidici responsabili della catalisi. L'enzima, che ha associato una molecola nel suo sito catalitico, è inibita perchè non può legare il substrato fino a quando la molecola inibitrice non si

disassocia dal sito catalitico. Substrato (S) ed inibitore competitivo (I_c) sono in competizione tra loro per associarsi al sito catalitico ed a concentrazioni costanti di enzima, le quantità relative di enzima complessate con il substrato e l'inibitore sono in relazione alle concentrazioni di S e di I_c ed ai rispettivi valori di affinità verso l'enzima di S e di I_c .

Se assumiamo che S ed I_c abbiano lo stesso valore di affinità per l'enzima e che le concentrazioni di S e di I_c siano uguali, abbiamo che l'enzima risulta inibito al 50% perchè un ugual numero di molecole di enzima si troverà legato rispettivamente al substrato e all'inibitore, proprio perchè l'enzima non discrimina tra S ed I_c , ed in conseguenza della casualità degli urti si avrà un ugual numero di complessi ES ed EI_c fino a quando le concentrazioni di S, I_c e P rimangono costanti.

Se confrontiamo le curve di saturazione da substrato in assenza ed in presenza di concentrazioni costanti di inibitore competitivo, vediamo che in presenza di inibitore si ha un valore maggiore di K_m , mentre l'enzima raggiunge gli stessi valori di V_{max} in ambedue le condizioni, ma in presenza di inibitore per raggiungere la V_{max} sono necessarie concentrazioni maggiori di substrato.

La costanza del valore di V_{max} nell'inibizione competitiva, cioè la rimozione dell'inibizione per incremento di concentrazione di S, avviene perchè aumentando la concentrazione S si rende più probabile l'incontro tra enzima e substrato e meno probabile quello tra E ed I_c . Quindi aumentando progressivamente la concentrazione di S finiremo sempre per raggiungere la V_{max} perchè quando le quantità di S rispetto ad I_c saranno molto grandi, l'enzima si troverà saturato da S anche in presenza di I_c . L'aumento di K_m osservato cineticamente in presenza di inibitore competitivo è apparente perchè in realtà le costanti K_1 , K_2 e K_3 dell'enzima non sono variate. L'enzima che lega il substrato non interagisce con l'inibitore e quindi nulla può essere cambiato nell'enzima. Da ciò la costanza del valore di V_{max} .

L'aumento di K_m risulta dal fatto che a concentrazioni di S non saturanti l'enzima, una parte di molecole di enzima non partecipa alla catalisi perchè hanno associato l'inibitore competitivo, per cui per le stesse concentrazioni di substrato in presenza di un inibitore si hanno valori inferiori di velocità iniziale solo perchè soltanto una frazione di molecole di enzimi è disponibile per la catalisi; mentre quando lo stesso enzima, sempre in presenza delle stesse quantità di I_c , viene saturato dal substrato, tutte le sue molecole vengono comunque coinvolte nella catalisi e viene raggiunto il valore di V_{max} come in assenza di inibitore competitivo. In presenza di I_c , il valore di K_m (calcolato da dati cinetici) (fig. 4-7) risulterà maggiore proprio perchè il valore della V_{max} rimane costante. Anche in presenza di I_c la curva di saturazione di S tende asintoticamente al valore di V_{max} che è lo stesso di quello della curva di saturazione in assenza di I_c ; ad alte concentrazioni di S le differenze tra le due curve sono trascurabili.

Un'alterazione della curva di saturazione dell'enzima

identica a quella osservata nell'inibizione competitiva pura, risultante in un incremento della K_m senza variazione del valore di V_{max} , può essere causata da un composto che si leghi sulla superficie dell'enzima in zone diverse dal sito catalitico e induce e/o stabilizza una conformazione dell'enzima che avrebbe breve vita in assenza di inibitore. In questa conformazione l'enzima diviene incapace a legare il substrato ed egualmente quando esso lega il substrato, l'enzima è incapace ad associare l'inibitore.

Quindi, quando si realizza questo meccanismo, anche se l'inibitore non è un analogo del substrato, la cinetica risulta quella dell'inibizione competitiva pura. Anche ioni monoatomici o molecole che si leghino al substrato impedendone la legatura all'enzima, determinano la cinetica dell'inibizione competitiva pura.

I dati cinetici danno scarsa informazione sul meccanismo dell'interazione dell'inibitore con l'enzima, quindi la definizione di inibitore competitivo è in genere basata su dati cinetici, si aggiunge l'aggettivo puro quando l'inibitore è analogo del substrato.

L'inibizione competitiva pura ha scarsa importanza fisiologica perchè essa è dipendente dalla concentrazione del substrato e quindi non può creare una forte inibizione perchè nelle cellule l'inibizione di un enzima porta ad un aumento della concentrazione del substrato che tenderà a rimuovere l'inibizione provocata dall'inibitore competitivo. L'inibizione competitiva pura ha un altro limite. Nella cellula i metaboliti subiscono trasformazioni successive nella sequenza di reazioni che costituiscono le vie metaboliche e dopo due o tre reazioni possono essere strutturalmente molto diversi dal metabolita da cui sono derivati: perciò gli intermedi metabolici hanno scarsa probabilità di interagire con il sito catalitico di enzimi della stessa via metabolica se non con quelli di cui sono i rispettivi substrati.

Inibizione non-competitiva.

L'inibizione non competitiva pura di un enzima è causata da composti e da ioni che si legano reversibilmente sulla superficie dell'enzima in zone diverse dal sito catalitico. L'inibitore non-competitivo puro (Inc) induce e/o stabilizza l'enzima in una conformazione che, in assenza di inibitore, non sarebbe assunta o comunque avrebbe una vita breve. In questa conformazione il sito catalitico dell'enzima risulta inattivo, mentre l'affinità dell'enzima per il substrato (S) rimane inalterata, per cui il substrato (S) può associarsi al sito catalitico ma non è trasformato in prodotto. Si assume che l'inibitore modifichi la disposizione di uno o più residui aminoacidici responsabili della catalisi e/o impedisca l'induced-fit senza alterare la disposizione dei residui aminoacidici responsabili della associazione del substrato. Se si confrontano le curve di saturazione dell'enzima da parte del substrato in assenza e presenza di concentrazioni costanti di inibitore non competitivo, si osserva che l'inibitore causa un abbassamento del valore della V_{max} mentre il valore della K_m

rimane inalterato.

I dati cinetici indicano che la presenza dell'inibitore non-competitivo corrisponde ad una diminuzione costante di una certa concentrazione di enzima a tutte le concentrazioni di substrato in cui viene dosato l'enzima. Infatti l'incremento della concentrazione del substrato non rimuove l'azione dell'inibitore perchè il substrato può legarsi con uguale affinità sia all'enzima libero di Inc che all'enzima complessato con Inc (EInc). Quindi il substrato, non potendo interferire nell'associazione di Inc con E, non può rimuovere l'azione inibitoria di Inc anche quando il substrato stesso è presente in alte concentrazioni saturanti l'enzima..

Quindi, poichè la presenza dell'inibitore corrisponde alla non disponibilità alla catalisi di un costante numero di molecole di enzima (quelle che hanno legato l'inibitore), la curva della V_i per la $[S]$ è relativa alle molecole di enzima libere dall'inibitore e quindi disponibili per la catalisi. Queste molecole di enzima si comportano come se l'inibitore non fosse presente e quindi hanno valori costanti di K_m e di numero di turnover, non essendo variati i valori delle loro costanti metaboliche k_1 , k_2 e k_3 . La V_{max} osservata cineticamente risulterà inferiore perchè in presenza di inibitore non-competitivo non tutte le molecole di enzima partecipano alla catalisi e non perchè il valore di k_3 sia diminuito. Tuttavia le molecole di enzima che hanno associato Inc, hanno la k_3 inferiore a quella che E ha in assenza di Inc. L'inibitore non competitivo può causare una riduzione fino al completo annullamento della efficienza catalitica delle molecole di enzima a cui è legato. Da ciò risulta il più basso valore della V_{max} , che considera l'insieme di tutte le molecole di enzima inibite e non inibite.

Essendo l'inibizione non competitiva reversibile, le molecole di enzima che hanno associato l'inibitore non sono le stesse nel tempo, ma il loro numero rimane costante. L'estensione dell'inibizione non-competitiva dipende dalla concentrazione di Inc e dalla sua affinità verso l'enzima. Gli effettori di regolazione agiscono su enzimi regolati con un meccanismo simile a quello sopra descritto per gli inibitori non-competitivi, le differenze esistenti tra l'inibizione di un enzima regolato e quella di uno non regolato, e nella natura dell'associazione dell'inibitore e del ruolo dell'inibizione. Nel primo caso essa è geneticamente determinata, cioè sulla superficie dell'enzima esiste un sito di legame specifico per l'inibitore e l'associazione dell'inibitore con l'enzima non è casuale. Inoltre l'azione dell'inibitore è fisiologica. Nel secondo caso il sito di legame per l'inibitore non-competitivo di un enzima non regolato, anche se può essere ad alta affinità e specificità non è geneticamente programmato. Infatti l'associazione tra enzima non-regolato ed inibitore è casuale o sperimentale e non svolge un ruolo fisiologico, anzi, se si escludono i farmaci, il ruolo è solamente dannoso per il metabolismo cellulare e dell'organismo.

Per azione di singole specie molecolari che agiscono su enzimi non regolati, si possono avere inibizioni miste con

alterazioni della cinetica della reazione enzimatica, che risultano in incrementi della K_m accompagnata da riduzione di V_{max} , ed altre in cui la K_m rimane costante pur essendo variate le costanti cinetiche k_1 , k_2 e k_3 , in modo da lasciare inalterato il valore della K_m . Esistono inoltre attivatori competitivi (la cui azione è rimossa per azione del substrato) e non-competitivi che hanno meccanismi riconducibili a quelli sopra descritti ed agiscono legandosi alla superficie dell'enzima (non al sito catalitico dove l'azione può essere solo di inibizione).

Le inibizioni e le attivazioni non fisiologiche delle proteine, dotate solo di associazione del substrato, sono sempre rimosse dal substrato perchè legare il substrato è l'unica proprietà della proteina.

Per gli enzimi ciò è vero se l'inibitore e l'attivatore sono di tipo competitivo (puro o no), perchè l'azione è sulla associazione del substrato (cioè come visto per le proteine dotate della sola capacità di associare il substrato).

L'azione sugli enzimi di inibitori non-competitivi puri non è rimossa da incrementi della concentrazione del substrato perchè l'affinità dell'enzima per il substrato non è modificata dalla presenza dell'inibitore.

Inibizione irreversibile di enzimi.

L'inibizione irreversibile degli enzimi, detta anche inattivazione, è l'alterazione permanente dell'attività biologica della proteina. L'inattivazione può risultare dalla perdita dell'affinità verso il legante substrato e/o dalla catalisi. L'alterazione è causata da molecole ed ioni che si legano con alta affinità alla molecola proteica o da reazioni covalenti (metilazioni, acetilazioni, ossidazioni) operate da particolari reattivi o da radiazioni.

L'associazione delle molecole o ioni e le reazioni possono avvenire nel sito attivo (in genere si ha la perdita completa dell'attività biologica) o sulla superficie della proteina, e causare un cambiamento di conformazione che altera permanentemente il sito attivo. In questo secondo caso la proteina può mantenere una parte della sua attività biologica. Questo tipo di inattivazione ha come meccanismo d'azione e come cinetica di reazione le caratteristiche dell'inibizione non-competitiva, tuttavia se ne differenzia perchè l'inattivatore ha una affinità molto alta per l'enzima e la sua reazione è considerata irreversibile.

L'inattivazione dell'enzima può essere ottenuta mediante denaturazione, cioè alterazione della sua conformazione che può essere causata da particolari soluti (es. urea, sodio dodecil-solfato), dal calore o pH estremi. In genere la denaturazione di un enzima è irreversibile. Talvolta è possibile far ritornare l'enzima nella conformazione naturale se si allontana l'agente che l'ha determinata.

Fig. 4-1

Curve della velocità iniziale di una reazione catalizzata da un enzima in relazione alla concentrazione del substrato.

a) L'enzima non è regolato e la curva $V_i/[S]$ è iperbolica.

b) L'enzima è dotato di associazione cooperativa del substrato. La curva $V_i/[S]$ è sigmoide. L'associazione cooperativa può essere spiegata con il modello di simmetria di conformazione o sequenziale, assumendo che sulla proteina esista un unico sito di legame per il substrato: il sito attivo. Nel modello della simmetria di conformazione il substrato, legandosi nel sito attivo, stabilizza la conformazione attiva favorendo così l'associazione del substrato alle altre subunità, e sempre legato allo stesso sito subirà l'azione di catalisi (figg. 3-7a+3-10).

La proteina permane nella conformazione fino a che l'enzima è impegnato nella catalisi. Nel modello sequenziale il substrato si lega ad una subunità, nel sito di catalisi induce il cambiamento di conformazione, e favorisce così l'associazione del substrato alle altre subunità (figg. 3-7b-3-10).

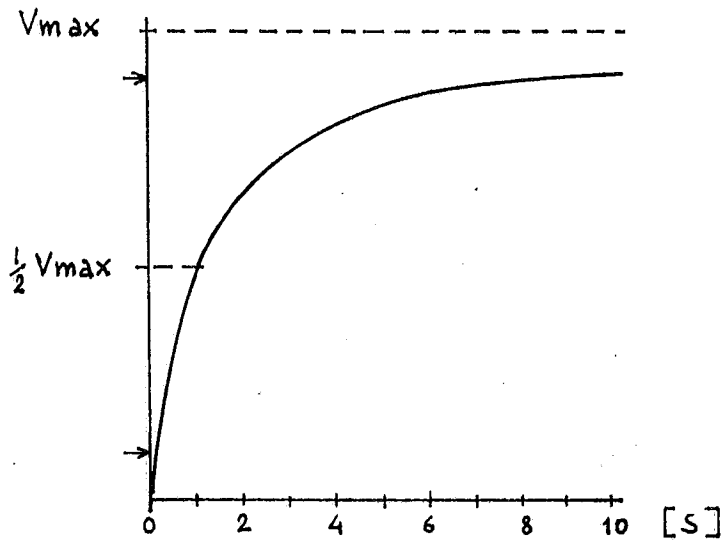
Quindi i modelli molecolari descritti nelle figure 3-7+3-10 sono validi anche per un enzima, con l'unica differenza che il sito attivo è anche dotato di catalisi. Quindi il substrato quando si lega alla proteina instaurando l'effetto cooperativo, fa aumentare l'affinità delle altre subunità verso il substrato, incrementa il numero dei complessi ES ed in questo modo anche la velocità della reazione catalizzata. L'associazione cooperativa del substrato dell'enzima può essere anche spiegata ammettendo che su ogni proteina siano presenti due siti di legame: uno, sito di regolazione, al quale il substrato si lega cooperativamente favorendo il mantenimento della conformazione attiva, l'altro, sito di catalisi, al quale il substrato si lega e viene trasformato in prodotto. Quindi il substrato si comporta come un attivatore e per questo effetto ha un sito specifico di regolazione. L'azione del substrato, favorendo l'assunzione della conformazione attiva della proteina, favorisce la sequenza di eventi molecolari che portano ad un incremento della velocità di reazione.

c) L'enzima è dotato di cooperatività negativa verso il substrato, la curva $V_i/[S]$ è iperbole simile.

Per questo tipo di enzima valgono le stesse assunzioni fatte in b) e per le proteine dotate di cooperatività negative ma non di catalisi (vedere fig. 3-9c) con la differenza che la cooperatività negativa non è spiegabile con il modello della simmetria di conformazione. Anche la cooperatività negativa verso il substrato può essere spiegata assumendo due siti di legame per il substrato, uno di catalisi ed uno di regolazione.

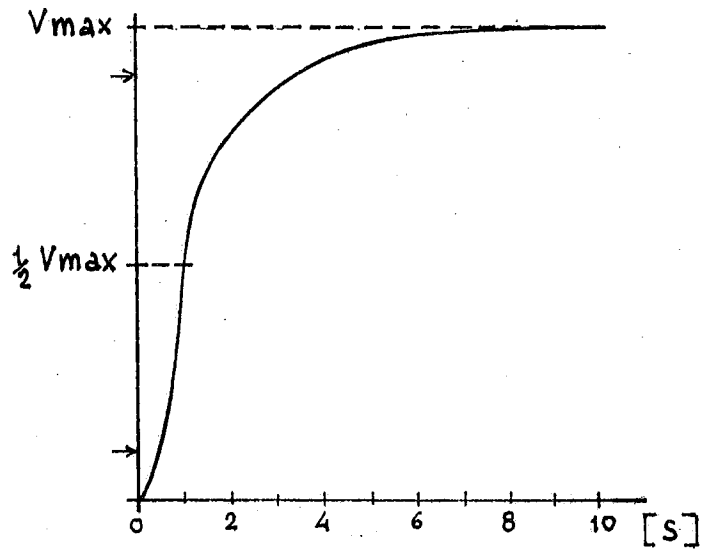
Le frecce sull'ordinata indicano i valori del 10% e 90% della V_{max} .

Fig. 4 - 1

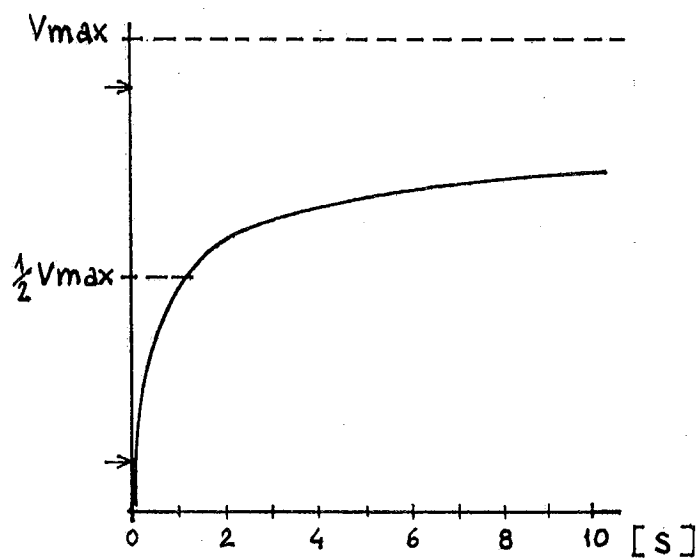


(a)

velocità iniziale (v_i)



(b)



(c)

Fig. 4-2

Grafico della velocità iniziale in funzione della concentrazione del substrato di una reazione catalizzata da un enzima regolato.

a) L'enzima è dotato di associazione cooperativa del substrato (curva 1) e di regolazione da effettori. L'enzima è sensibile ad un attivatore (curva 2) e ad un inibitore (curva 3).

La sensibilità agli effettori è spiegabile assumendo che le subunità abbiano oltre al sito catalitico, due siti di regolazione rispettivamente capaci di associare l'attivatore e l'inibitore. In presenza di attivatore viene stabilizzata la conformazione attiva, cioè quella affine (o più affine) al substrato, quindi con la stessa $[E]$, in presenza di attivatore, si formeranno più complessi $[ES]$ e quindi verrà incrementata la V_i (confrontare la curva 1 con la curva 2). Tuttavia, incrementando la concentrazione del substrato, si raggiungono ugualmente i valori vicini alla V_{max} perché il substrato, per effetto della cooperatività di associazione, spinge la proteina verso la conformazione attiva. In presenza di inibitore viene stabilizzata la conformazione non affine (o meno affine) al substrato, per cui con la stessa $[S]$ si formeranno meno complessi $[ES]$ e quindi la V_i diminuirà (confrontare le curve 1 e 3). Tuttavia, aumentando la concentrazione del substrato e mantenendo l'inibitore costante, l'inibizione è rimossa perché il substrato spinge l'equilibrio di conformazione verso la conformazione attiva. In presenza di inibitore occorreranno concentrazioni maggiori di substrato, ma la velocità massima sarà raggiunta ugualmente.

Il modello molecolare dell'enzima può essere quello indicato in fig. 3-10a) (modello di simmetria di conformazione) o quello di fig. 3-10f (modello sequenziale), assumendo che il sito attivo della proteina descritta in questa figura sia anche dotato di attività catalitica.

L'enzima ha tutta la potenzialità di regolazione della proteina descritta in figura 4-1b. La potenzialità di regolazione da effettori della velocità iniziale della reazione è indicata dalla linea verticale tratteggiata indicata dalla freccia 5. Anche con la $[S]$ costante, la velocità di reazione può essere variata da valori minimi fino a valori molto vicini alla V_{max} .

La freccia 4 indica che V_i relativamente basse (meno del 10% della V_{max}) sono raggiungibili con $[S]$ relativamente alte se l'enzima è dotato di effetto cooperativo (curva 1), mentre se l'enzima non ha tale effetto, occorre scendere a valori di $[S]$ molto vicini allo zero (curva 2).

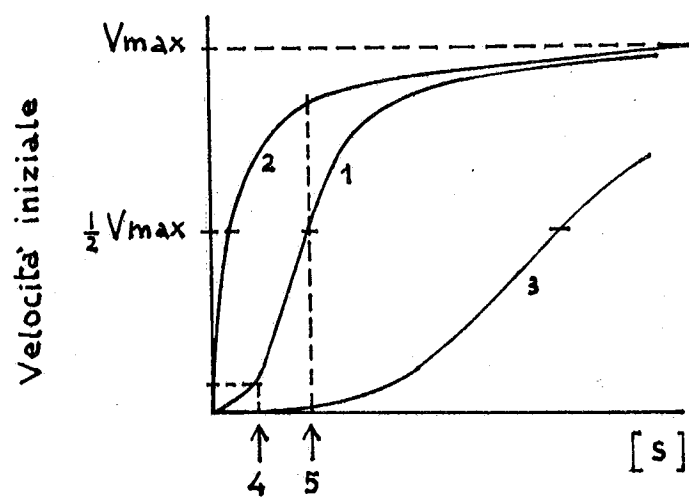


Fig. 4 - 2

Fig. 4-3

Regolazione da effettori della velocità intrinseca di catalisi di un enzima.

a) Curve della V_i in funzione della concentrazione del substrato.

Le tre curve sono iperboliche perchè l'enzima non associa cooperativamente il substrato, potendosi legare con la stessa affinità con l'enzima sia nella conformazione attiva che nella conformazione inattiva. Le tre curve sono descritte utilizzando la stessa concentrazione di enzima. Curva 1: l'enzima è in presenza del substrato. La V_i aumenta fino ad un massimo (V_{max}) descrivendo una curva iperbolica. Curva 2: l'enzima è in presenza di una concentrazione costante di un attivatore. In queste condizioni, la V_i risulta maggiore rispetto alla curva 1 per ogni concentrazione di substrato, inclusa la V_{max} .

Curva 3: l'enzima è in presenza di una concentrazione costante di inibitore. Rispetto alla curva 1 la V_i risulta minore per ogni concentrazione di substrato, V_{max} inclusa. Il cambiamento del valore della V_{max} in presenza degli effettori indica che il substrato non influenza l'equilibrio di conformazione dell'enzima, e cioè che ha la stessa affinità per le due conformazioni, mentre è variato il valore della k_3 . La variazione della k_3 causa un cambiamento della K_m , tuttavia non è osservabile cineticamente (linea tratteggiata verticale) perchè la variazione della k_3 è vista cineticamente come una variazione del numero di molecole di proteina (variazione della concentrazione di P) e quindi come variazione della V_{max} senza apparente variazione della K_m .

La freccia indica la concentrazione di S in cui la V_i è uguale a $1/2 V_{max}$ nelle tre curve. Variando la concentrazione dell'attivatore e dell'inibitore, si può far variare la V_i senza far variare la $[S]$.

b) Modello del meccanismo molecolare di un enzima regolato per variazione della velocità intrinseca di catalisi. Il substrato ha la stessa affinità per l'enzima nelle due conformazioni, può associarsi all'enzima nella conformazione inattiva (quadrati) con la stessa affinità con cui si lega all'enzima nella conformazione attiva (cerchi). In figura questa possibilità è indicata da una sito catalitico uguale nelle due conformazioni. Il triangolino all'interno del sito di legame del substrato dell'enzima nella conformazione inattiva (quadrati) indica che il sito non è capace di operare la catalisi. Pur legandosi alla conformazione inattiva, il substrato non è convertito in prodotti (o ciò avviene molto più lentamente di quando il substrato è associato all'enzima nella conformazione attiva).

L'inibitore stabilizza la conformazione inattiva e si associa non cooperativamente all'enzima (vedere fig. 3-10). L'inibizione dell'enzima risulta in una riduzione del numero delle molecole nella conformazione attiva e quindi in una riduzione della velocità iniziale.

c) Meccanismo di regolazione per variazione della velocità intrinseca di catalisi di un enzima monomero. Questa figura vuol puntualizzare che non essendo presente l'effetto cooperativo, il meccanismo di regolazione può realizzarsi in

enzimi monomerici e risultare nelle stesse curve cinetiche indicate in a) per l'enzima tetramerico.

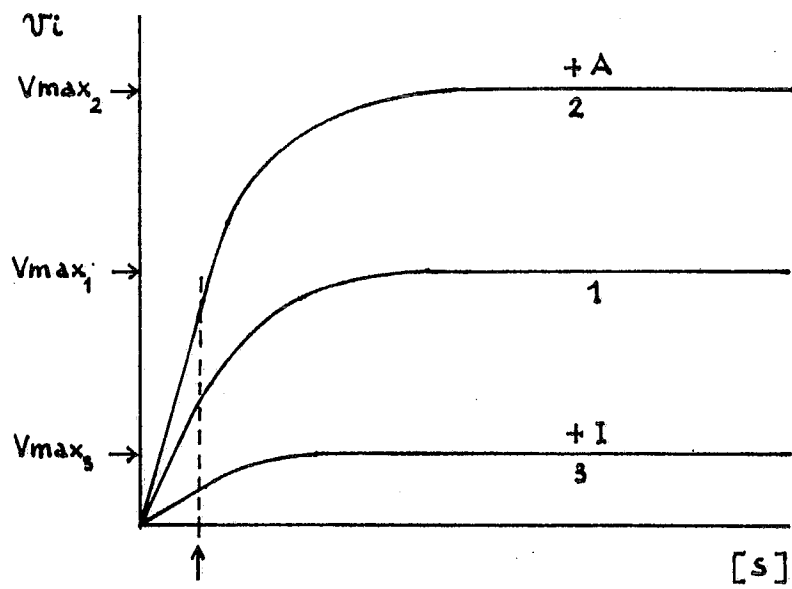
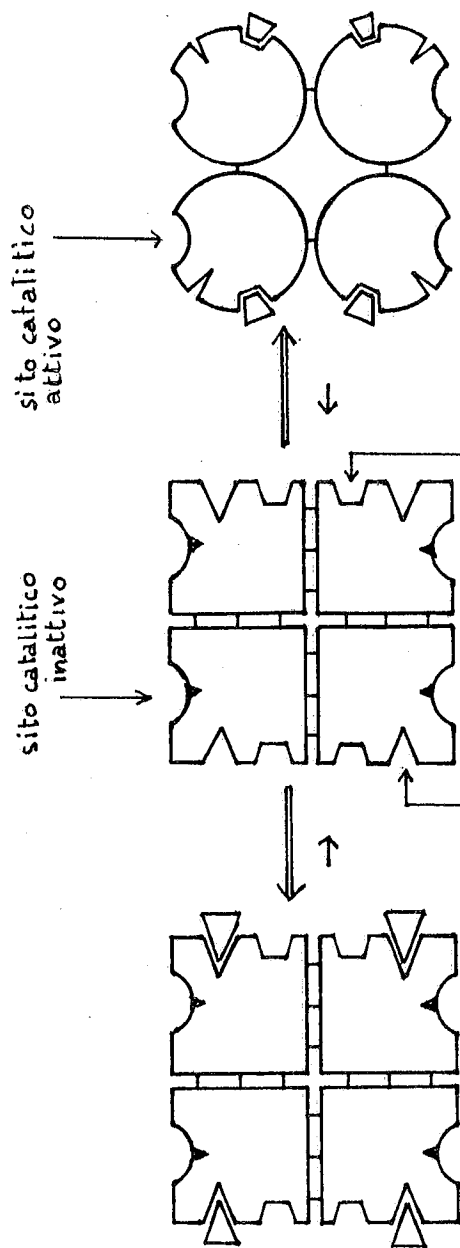
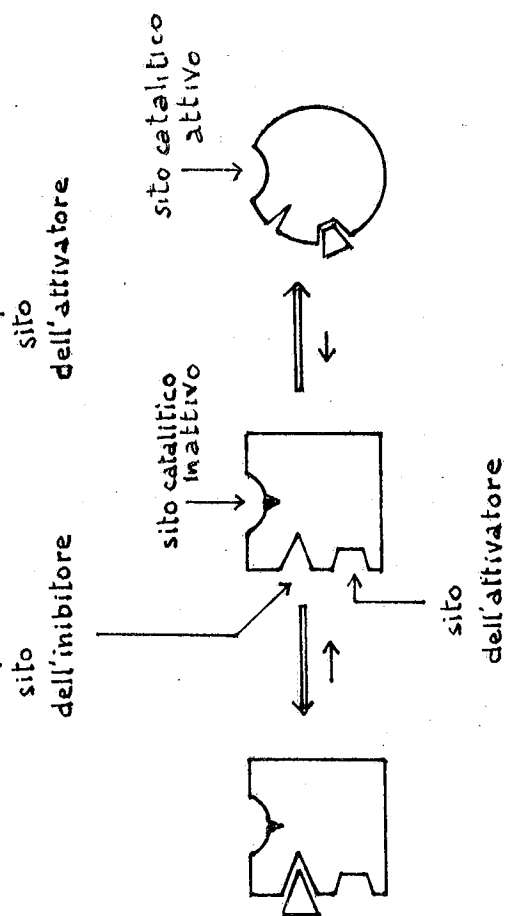


Fig. 4-3 (a)



b)



c)

Fig. 4-3

Meccanismo molecolare di regolazione da effettore di un enzima tetramerico.

Questo meccanismo di regolazione è particolare perché possiede subunità differenti: 2 subunità catalitiche, ciascuna con un sito catalitico, e due subunità di regolazione, con un sito di regolazione per un attivatore. L'enzima nella sua forma tetramerica è cataliticamente inattivo, in questa forma può associare una molecola di attivatore su ogni subunità.

L'inibitore induce un cambiamento di conformazione nella subunità di regolazione che causa la dissociazione delle subunità catalitiche da quelle di regolazione, e la dissociazione delle subunità catalitiche tra loro, mentre le subunità di regolazione rimangono unite. Con questo cambiamento di struttura quaternaria le subunità catalitiche divengono libere e cataliticamente attive. Nello schema si è ipotizzata una attivazione per incremento dell'affinità verso il substrato, tuttavia l'attivazione può anche avvenire per incremento dell'attività intrinseca di catalisi. Il meccanismo è reversibile perché è sufficiente che la concentrazione dell'attivatore libero in soluzione diminuisca, che i complessi subunità di regolazione-attivatore, cominceranno a dissociarsi, e così le subunità catalitiche e di regolazione a riassemblarsi in tetrameri cataliticamente inattivi. Questo meccanismo di regolazione è particolare e si differenzia per alcuni aspetti da quelli proposti nelle figg. 3-1, 3-8+3-10, 4-3; tuttavia come quei meccanismi, richiede un cambiamento di conformazione della proteina per realizzare l'attivazione. L'interazione tra attivatore e substrato è eterotropica, essendo composti diversi.

Il meccanismo descritto in figura schematizza il meccanismo di regolazione dell'enzima proteina cinasi, un enzima che fosforila le proteine utilizzando ATP come donatore di acido fosforico. La proteina cinasi fa parte del meccanismo di regolazione degli enzimi operato dagli ormoni (fig. 7-9) ed il suo attivatore è il cAMP, composto la cui concentrazione cellulare è sotto controllo ormonale.

Una interpretazione sulla funzione della dissociazione delle subunità, è che essendo il substrato anch'esso una proteina, quindi con bassa velocità di diffusione, le subunità libere possono diffondere più velocemente ed associarsi più agevolmente alla proteina da fosforilare.

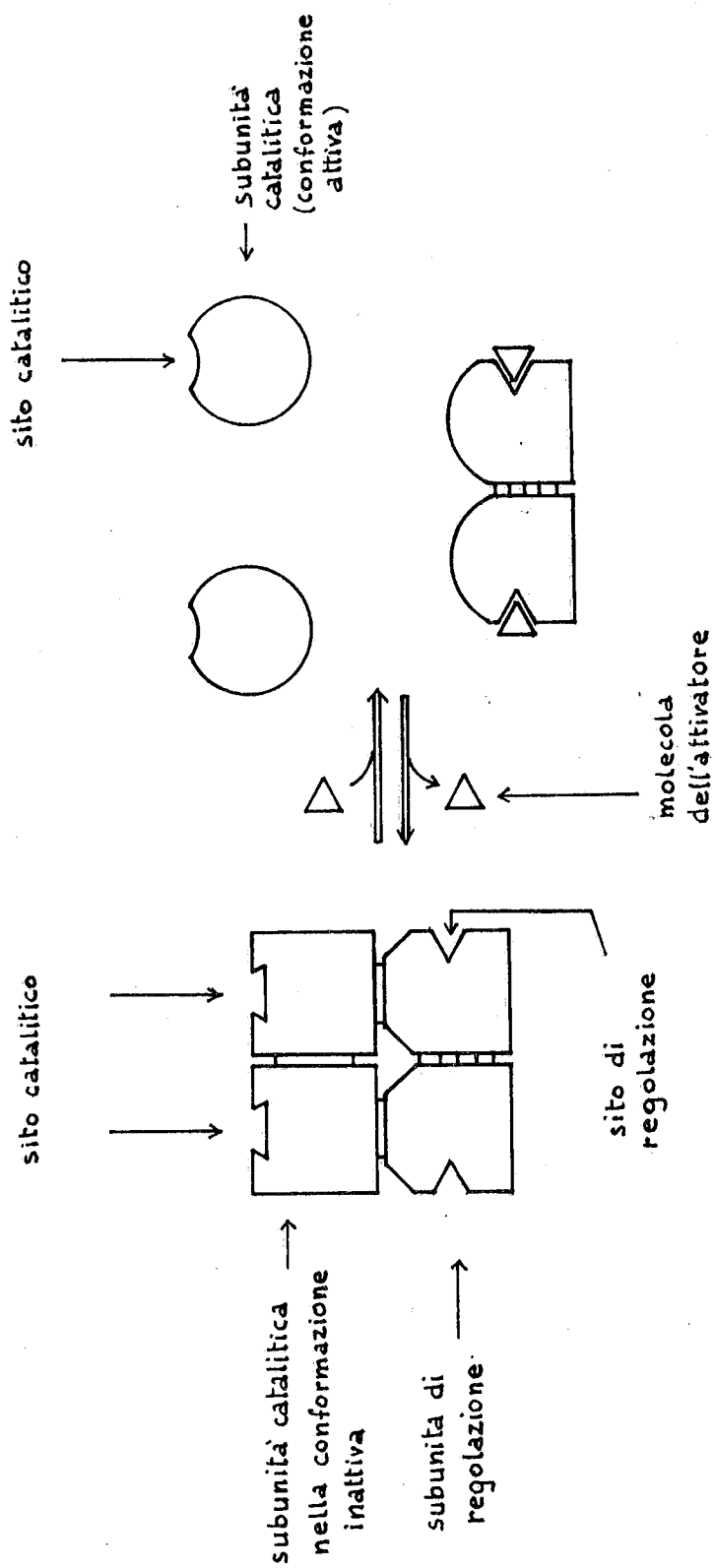


Fig. 4-4

Fig. 4-5

Meccanismo molecolare di regolazione di un enzima mediante effettori e modificazioni covalenti. La proteina enzimatica esiste in due conformazioni stabili: una cataliticamente inattiva ed una attiva. Il cambiamento dalla conformazione inattiva a quella attiva, è indotto da una reazione di fosforilazione, catalizzata da una proteina cinasi che lega un gruppo fosfato dell'ATP ad un residuo aminoacidico (serina, treonina o tirosina) della proteina. Il cambiamento di conformazione inverso avviene per rimozione idrolitica del gruppo fosfato operato da una proteina fosfatasi. La stessa proteina enzimatica può anche subire un cambiamento conformazionale indotto da un legante effettore positivo (attivatore) che si lega con alta affinità reversibilmente ad un sito di regolazione specifico. L'azione dell'attivatore rende le subunità non affini all'inibitore. La conformazione inattiva è stabilizzata da un legante effettore negativo (inibitore), l'azione dell'inibitore rende la subunità non affine all'attivatore.

La proteina può essere regolata dalle concentrazioni dei due effettori e dall'azione degli enzimi cinasi e fosfatasi, tuttavia il controllo dell'enzima mediante fosforilazione prevale su quello esercitato dagli effettori. Quando la proteina è fosforilata, è insensibile all'azione degli effettori non avendo affinità per essi. Quindi l'azione degli effettori è esercitata solo sulla proteina non fosforilata. L'azione della proteina cinasi può rimuovere l'azione degli effettori perchè fosforilando la proteina quando è nella conformazione inattiva, anche se libera da effettori, la sottrae alla reazione con gli effettori stessi. Questa sottrazione di molecole di enzima nella conformazione inattiva, per azione di massa, causa la dissociazione degli effettori (positivi e/o negativi) dall'enzima e ristabilisce l'equilibrio. L'azione della cinasi prevale su quella degli effettori perchè stabilizza la conformazione attiva con la formazione di un legame covalente (fosforilazione) che può essere rimosso solo per azione di un enzima specifico (proteina fosfatasi) che a sua volta può essere regolato. Mentre i complessi proteina-effettore si dissociano spontaneamente e continuamente per azione dell'agitazione molecolare. Quindi esiste una competizione tra effettore e proteina cinasi per associare l'enzima regolato, ma non tra effettore ed enzima fosforilato. L'azione della proteina cinasi finisce per prevalere su quella degli effettori perchè il prodotto di reazione (enzima fosforilato) è molto più stabile del complesso enzima-effettore. La fosforilazione prevale su quella da effettore sia che attivi l'enzima (questa figura) sia che inibisca l'enzima (vedere fig. 7-9). Esiste un caso in cui l'effettore non regola direttamente l'enzima ma agisce inserendosi nel meccanismo di regolazione aperto dagli ormoni (vedere glicogeno fosforilasi-a e glucosio in fig. 7-9). L'effettore si lega all'enzima fosforilato e lo rende più sensibile all'azione della proteina fosfatasi, per cui l'enzima stesso viene più rapidamente defosforilato. L'enzima defosforilato è la forma

meno attiva e l'effettore è un inibitore dell'enzima. Questo è un caso particolare di regolazione da effettore, perchè l'effettore si lega al substrato, cioè all'enzima fosforilato, per attivare l'azione dell'enzima proteina-fosfatasi, e quindi non ha le caratteristiche dei meccanismi molecolari descritte sopra, dove l'azione ormonale ha la prevalenza su quella da effettori ed inoltre perchè l'azione dell'effettore è in accordo e non in opposizione a quella ormonale.

In figura l'effettore positivo induce e stabilizza il cambiamento di conformazione da inattiva ad attiva, mentre l'effettore negativo stabilizza la conformazione inattiva. La regolazione di uno stesso enzima mediante effettori e quella mediante reazioni covalenti, svolgono ruoli diversi. La prima risponde ad esigenze cellulari, la seconda ad esigenze dell'organismo essendo la maggior parte gli enzimi proteina cinasi e proteina fosfatasi regolata da ormoni. I due tipi di regolazione possono coesistere e rispondere opportunamente ai due tipi di esigenza.

Esistono enzimi proteina cinasi che sono regolati da effettori e non da ormoni (fig. 7-9, piruvato deidrogenasi) ed altri dei quali non si conosce ancora se sono regolati.

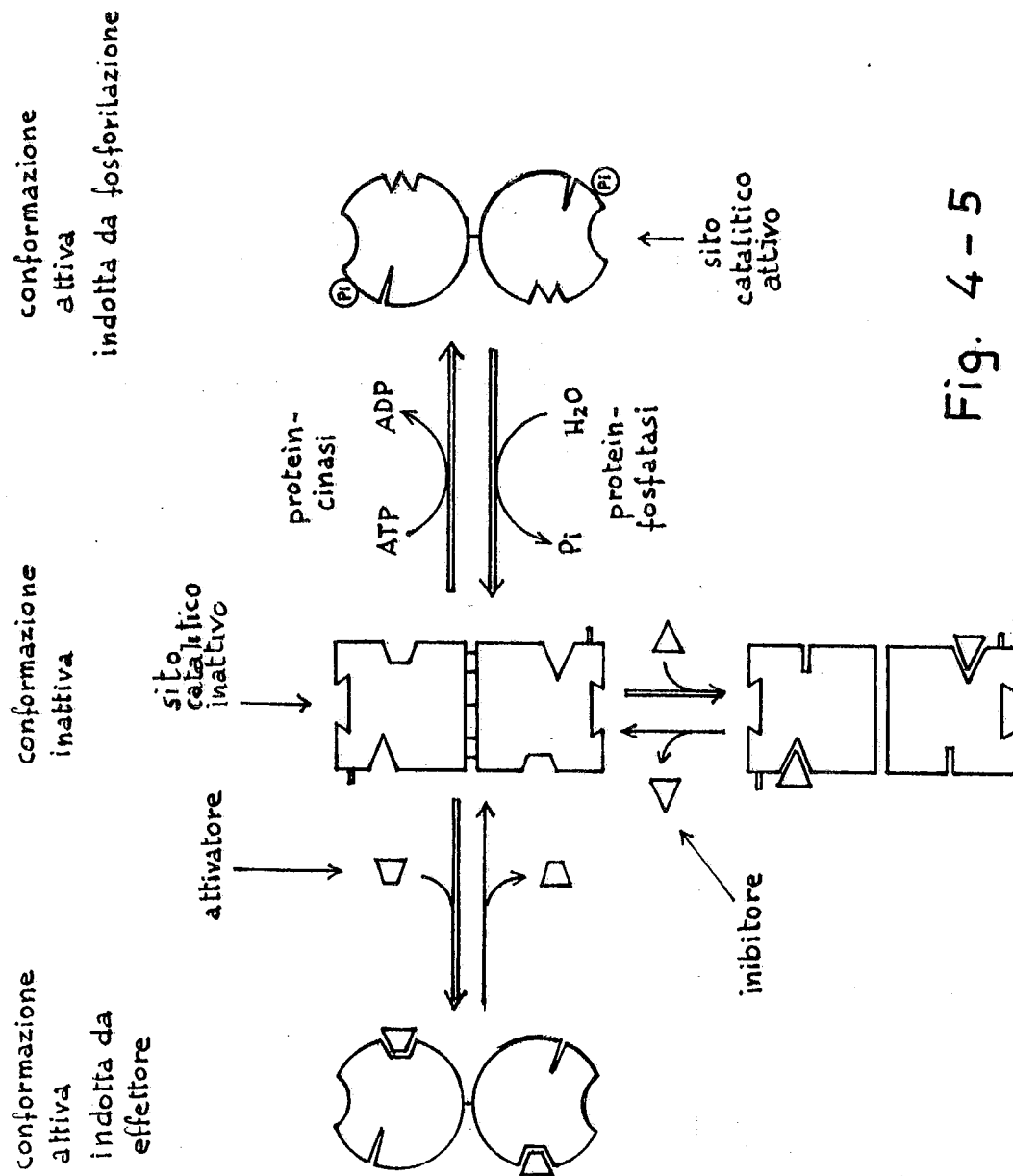


Fig. 4 - 5

Fig. 4-6

Curve di saturazione da substrato (L_s) di un enzima regolato mediante effettori e mediante fosforilazione.

L'enzima considerato ha le caratteristiche molecolari descritte nella fig. 4-5.

a) Regolazione mediante effettori.

Curva 1: non sono presenti effettori e l'enzima è tutto nella forma defosforilata. L'enzima non ha attività perchè nel modello molecolare si è assunto che la conformazione attiva possa essere assunta solo per azione dell'attivatore e/o mediante fosforilazione. In assenza dell'uno o dell'altro, l'enzima è tutto nella conformazione inattiva ed il substrato, anche in concentrazioni saturanti, non influisce sull'equilibrio di conformazione. La regolazione è sull'attività intrinseca di catalisi dell'enzima.

Curva 2 e 3: sono curve di saturazione da L_s , in presenza di attivatore rispettivamente in concentrazione non saturante e saturante l'enzima. Si assume che la proteina sia tutta non fosforilata e l'inibitore non sia presente. Se la proteina fosse in parte fosforilata, a parità di $[L_s]$ e di $[legante-effettore]$, si avrebbero maggiori valori di V_i , e di V_{max} di quelli della curva 2, ma non della curva 3. La curva 3 è la curva di saturazione da L_s quando tutte le molecole di enzima sono nella conformazione attiva, indipendentemente da come (effettore o fosforilazione) le mantenga tali. Poichè il numero di molecole di proteina è costante, la curva 3 non può variare. Con $[L_s]$ e $[L-attivatore]$ costanti, aggiungendo inibitore si hanno valori di V_i inferiori, incluso quello di V_{max} , perchè L_s non influenzando l'equilibrio di conformazione, può legarsi solo a molecole di enzima nella conformazione attiva (che hanno legato l'attivatore o che sono fosforilate)

b) Regolazione mediante fosforilazione.

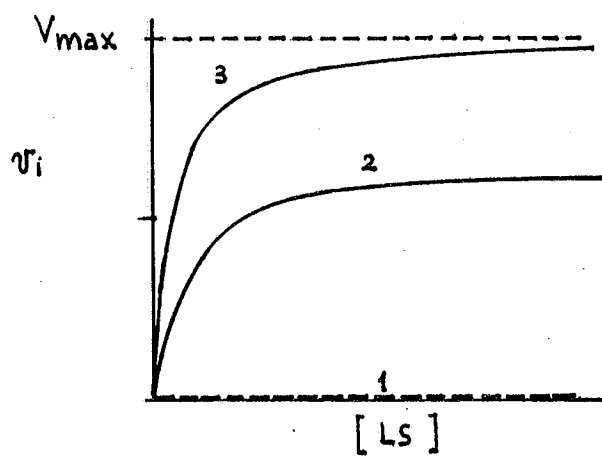
Curva 1: la proteina è tutta defosforilata, ed essendo assenti gli effettori è tutta nella conformazione inattiva. Anche se il substrato è in concentrazione saturante, non può influire sull'equilibrio di conformazione, si è assunto che la conformazione attiva sia possibile solo in presenza di attivatore o per azione della fosforilazione, che inducono la conformazione attiva.

Curva 2: parte delle molecole di enzima sono fosforilate, la curva di saturazione è iperbolica perchè il substrato non è associato cooperativamente.

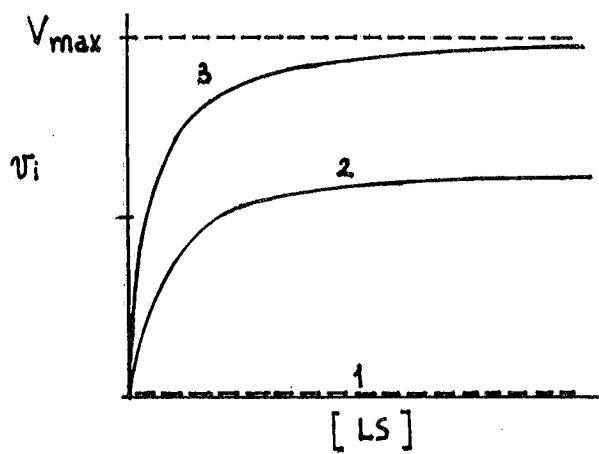
Nelle condizioni di parziale fosforilazione dell'enzima (es. curva 2), le molecole di enzima non fosforilate, possono essere attivate da effettore. In queste condizioni ed in relazione alla $[attivatore]$, la curva di saturazione da L_s risulta intermedia tra le curve 2 e 3, e con $[attivatore]$ saturanti, coincidente con la curva 3.

La curva 3 è la curva di saturazione da L_s dell'enzima, le cui molecole sono tutte fosforilate e quindi tutte attive. Se assumiamo che l'enzima sia completamente attivo per azione dell'attivatore, ed in questa condizione viene fosforilato in tutte le sue molecole, l'attività dell'enzima non cambia ma esso diviene insensibile alla regolazione da effettore. Quando l'enzima viene defosforilato torna automaticamente nella conformazione inattiva e quindi torna

ad essere sensibile agli effettori. Per semplificare abbiamo assunto che l'enzima di fig. 4-5 non potesse assumere spontaneamente la conformazione attiva (ma solo in presenza di attivatore o per fosforilazione) per cui il substrato non poteva influire sull'equilibrio di conformazione. Se l'enzima fosse stato dotato di tale proprietà, con $[L_s]$ saturanti l'enzima, si raggiungerebbe comunque il valore di V_{max} , ed in relazione al tipo di rapporto esistente tra le due subunità dell'enzima si potrebbe avere l'associazione cooperativa del substrato e dell'attivatore. In questo caso la curva di saturazione da substrato sarebbe sigmoide.



(a)



(b)

Fig. 4 - 6

Inibizione competitiva.

a) Effetto di un inibitore competitivo analogo del substrato sulla velocità della reazione catalizzata da un enzima non regolato. 1 e 2 sono le curve di saturazione da S dell'enzima, rispettivamente in assenza e presenza dell'inibitore.

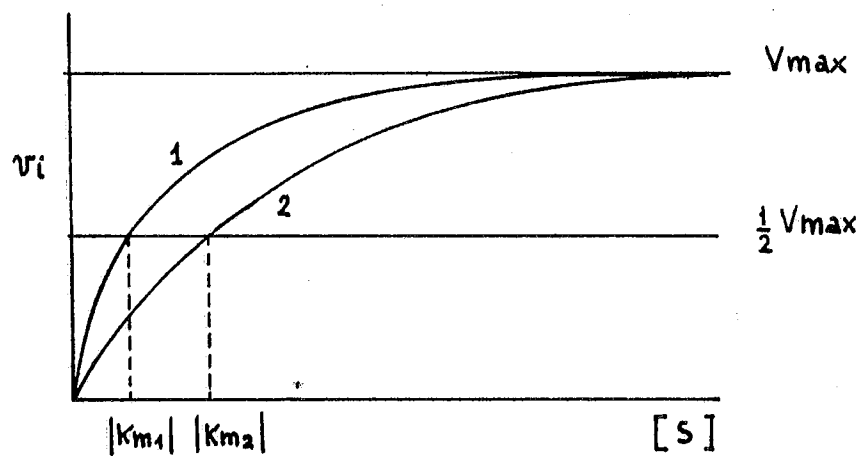
a) Si osserva l'incremento del valore della K_m mentre la V_{max} rimane costante. Con K_{m1} e K_{m2} si intendono i valori delle $[S]$ rispettivamente in assenza ed in presenza di inibitore che determinano la $V_i = \frac{1}{2}V_{max}$ e che corrisponde ai valori della K_m dell'enzima nelle due condizioni.

b) L'equazione mostra che S si lega solo ad E libero dall'inibitore. Incrementando la concentrazione di S si favorisce la formazione del complesso ES, la conseguente sottrazione di E libero favorisce la dissociazione del complesso EIC, per cui aumentando la concentrazione di S a valori sufficientemente alti, l'inibizione è rimossa quasi totalmente perchè la quasi totalità dell'enzima è nella forma di complesso ES.

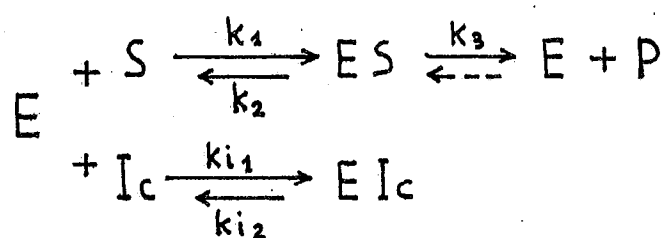
Non si può parlare di completa rimozione dell'inibizione perchè, essendo presente Ic, esisteranno sempre dei complessi EIC. k_{i1} e k_{i2} sono le costanti cinetiche della reazione di formazione e di dissociazione del complesso EIC.

c) Substrato (S) ed inibitore competitivo (Ic) si legano ambedue al sito catalitico dell'enzima (E); l'azione inibitoria di Ic su E è causata dalla sua associazione al sito catalitico, ed in questo modo esclude la possibilità dell'associazione di S (inibizione competitiva pura).

d) L'inibitore si lega sulla superficie dell'enzima ed induce (o stabilizza) una conformazione che non è affine al substrato. Il substrato stabilizza la conformazione naturale dell'enzima ed esclude la possibilità di associazione dell'inibitore. Anche con questo meccanismo si ottiene una cinetica di reazione da inibitore competitivo.

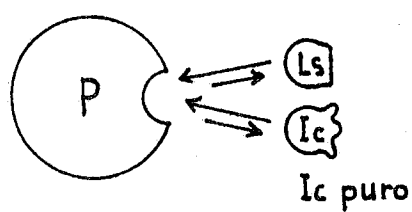


(a)

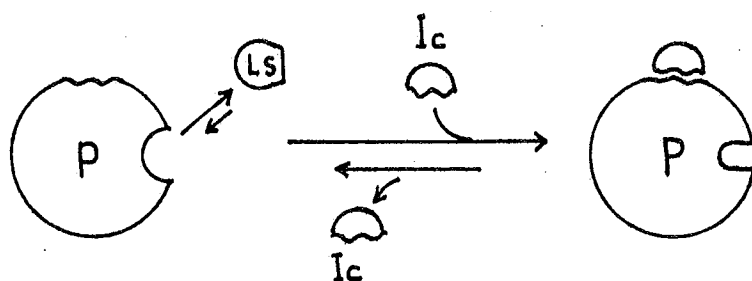


(b)

Fig. 4-7



(c)



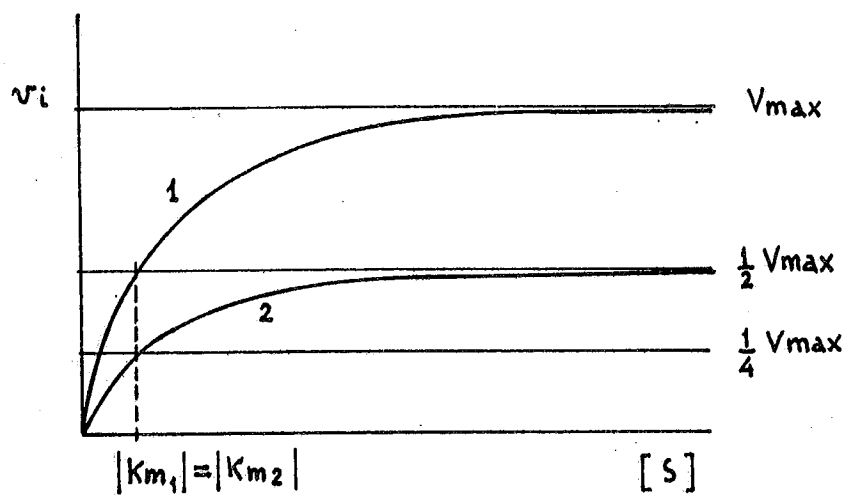
(d)

Inibizione non-competitiva.

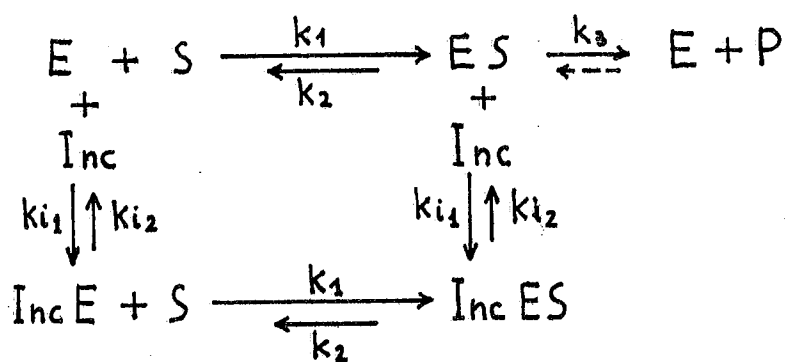
a) Effetto di un inibitore non-competitivo sulla velocità di una reazione catalizzata da un enzima non regolato. 1 e 2 sono le curve di saturazione da substrato dell'enzima rispettivamente in assenza e presenza dell'inibitore. Si osserva la riduzione della V_{max} mentre la K_m rimane costante.

b) S ed Inc si associano all'enzima indipendentemente l'uno dall'altro. S si lega con la stessa affinità al sito catalitico di E libero o complessato con Inc (k_1 e k_2 rimangono invariate in assenza o presenza del Ic sulla molecola di E). Egualmente, Inc si lega con uguale affinità sia all'enzima libero (E) che complessato con il substrato (ES). Le costanti cinetiche delle reazioni di associazione di E e Inc (k_{i1}) e quello della dissociazione del complesso EInc (k_{i2}) rimangono anch'esse invariate. L'azione dell'inibitore non competitivo è sulla efficienza catalitica dell'enzima, lasciando inalterata la sua affinità verso S. Il substrato, potendosi legare con la stessa affinità all'enzima libero come a quello complessato con Inc, non può rimuovere l'inibizione anche se è presente in concentrazioni saturanti l'enzima.

c) L'inibitore non competitivo (Inc) si lega specificamente sulla superficie dell'enzima, induce un cambiamento della conformazione che rende l'enzima inattivo cataliticamente, ma ancora capace di associare il legante con la stessa affinità.



(a)



(b)

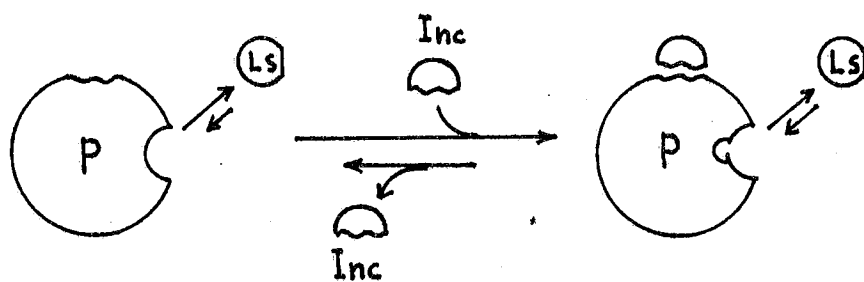


Fig. 4 - 8

La via metabolica.

La via metabolica è una sequenza di reazioni in cui un prodotto della prima reazione è reagente della seconda e così avanti fino al prodotto dell'ultima reazione (vedere fig. 5-1a). Tutte le reazioni di una via metabolica sono catalizzate da enzimi. Le reazioni che avvengono nei sistemi biologici sono in genere bimolecolari nei due sensi (esistono eccezioni, vedere dopo); tuttavia solo uno dei prodotti di reazione viene utilizzato come reagente della reazione successiva, ed è quello che subirà le trasformazioni operate nella via metabolica.

Esiste così la serie di metaboliti che provengono dalla struttura covalente del primo reagente (1° substrato del 1° enzima della via metabolica); questa struttura viene progressivamente trasformata nella via metabolica. Altri metaboliti partecipano alle stesse reazioni e partecipano in genere ad una sola reazione. Questo secondo tipo di reagenti può essere:

a) l'ATP, quando viene sintetizzato e quando viene idrolizzato per fornire energia libera per far procedere la reazione a cui partecipa, sia fosforilando o no l'altro substrato della reazione; b) il NAD^+ od il NADH , a seconda che il substrato debba essere ossidato per deidrogenazione o ridotto. Identiche considerazioni possono essere fatte per il NADP^+ ed il NADPH (in genere NAD^+ e NADH intervengono in reazioni di vie metaboliche degradative, mentre il NADP^+ ed il NADPH in reazioni di vie metaboliche sintetiche); c) le molecole di H_2O , di P_i e di altri metaboliti, o parti di molecole trasportate da coenzimi (es. Acetil-CoA) che sono aggiunte o perse nella reazione.

Se prendiamo ad esempio la glicolisi anaerobica, la via è costituita da una sequenza di reazioni (figg. 5-2, 5-3) che trasformano una molecola di glucosio in due molecole di acido lattico. Esiste una serie di metaboliti intermedi che sono il prodotto di trasformazioni operate sulla struttura covalente del glucosio (G6P , F6P , F1,6diP , ecc.). Inoltre sono metaboliti della via (reagenti o prodotti) ATP, ADP, P_i , NAD^+ , NADH , H_2O , ed un altro prodotto finale della glicolisi è proprio l'ATP (2 molecole/molecola di glucosio). Eccezioni alla regola della bimolecolarità delle reazioni biologiche sono presenti nella glicolisi stessa: la reazione aldolasica che scinde una molecola di fruttosio 1,6diP in due, formando 3-P-gliceraldeide ed idrossi-aceton fosfato, la reazione enolasica che da una molecola di 2-P-glicerato, produce il fosfoenolpiruvato ed acqua, le reazioni di isomerizzazione.

I metaboliti intermedi di una via metabolica sarebbero anche reagenti di molte differenti reazioni non utili alle cellule. Tuttavia queste reazioni, anche se termodinamicamente possibili all'interno della cellula

stessa, devono essere considerate inesistenti perchè troppo lente, non essendo catalizzate da enzimi (fig. 5-1a). Gli atomi delle molecole biologiche sono uniti da legami covalenti e questi legami non sono spezzati dall'agitazione delle molecole a 37° C. Le reazioni tra queste molecole richiedono alte energie di attivazione e solo la catalisi enzimatica rende le reazioni sufficientemente veloci per far fronte alle richieste energetiche e sintetiche della vita. L'incremento operato dagli enzimi è molto alto, da 10^6 - 10^{14} e ciò rende non significativa la velocità delle reazioni non catalizzate.

Le principali caratteristiche degli enzimi: specificità di substrato (i), specificità di reazione e catalisi sono i fattori della via metabolica, piuttosto che le capacità reattive degli intermedi metabolici per quelle determinate reazioni. Infatti, senza catalisi enzimatica, la cellula sarebbe il contenitore di soluti inerti; la catalisi senza specificità porterebbe a composti non voluti dalla cellula. Una via metabolica si identifica con la sequenza delle reazioni enzimatiche che la compongono; infatti delle molte possibili reazioni a cui i substrati potrebbero andare incontro, ogni enzima ne catalizza una sola. Specificità e potere di catalisi determinano la conversione rapida del 1° substrato nel prodotto (i) finale.

Il metabolismo cellulare, più che un insieme di vie metaboliche distinte è una rete di vie; inoltre per ogni via di sintesi di un composto ne esiste un'altra che funziona in senso contrario, per cui la maggior parte dei metaboliti partecipa a più di una reazione enzimatica. E' quindi importante per la vita della cellula, la presenza di un preciso controllo sulle vie metaboliche, al fine di controllare le concentrazioni dei metaboliti, in particolare dei prodotti finali.

Questo accurato dosaggio di metaboliti è detto regolazione del metabolismo, ed è basato sulla proprietà di regolazione che hanno alcuni enzimi della via metabolica.

Termodinamica della via metabolica.

Tutte le reazioni di una via metabolica procedono nello stesso verso ed hanno valori di $\Delta G'$ negativi o vicini allo zero (l'apostrofo indica che il ΔG è stato calcolato con $[H^+]$ costante, anche se H^+ compare nella reazione, perchè nella cellula la $[H^+]$ varia molto poco). Il verso della via metabolica è quello di tutte le sue reazioni ed è detto anche verso del flusso metabolico.

In una via metabolica, la maggior parte delle reazioni è all'equilibrio o vicina a questo ($\Delta G' = 0$), ed almeno una reazione non è all'equilibrio ($\Delta G' < 0$) e tende a raggiungerlo nel verso della via metabolica (tab. 5-1, figg. 5-3, 5-5). I valori dei $\Delta G'$ sono calcolati dalle concentrazioni cellulari dei metaboliti, che si ottengono bloccando rapidamente l'attività degli enzimi (congelando o con acidi forti). Bisogna considerare che le concentrazioni dei metaboliti, anche se costanti, sono allo stato stazionario.

Quindi, anche se una reazione ha reagenti e prodotti nelle

concentrazioni uguali a quelle del suo equilibrio termodinamico, la reazione non è all'equilibrio e può procedere molto rapidamente perchè ogni molecola di reagente che viene trasformata in prodotto, è immediatamente rimpiazzata, ed inoltre contemporaneamente viene sottratta una molecola di prodotto ad opera della reazione successiva. Quindi si ha una sintesi netta di prodotto senza alterare la concentrazione dei reagenti e dei prodotti. In genere, quando si parla di una reazione all'equilibrio nella cellula, si intende che le concentrazioni dei suoi reagenti e prodotti siano allo stato stazionario, ed abbiano valori uguali a quelli della stessa reazione quando è all'equilibrio termodinamico.

Se una via metabolica ha una sola reazione non all'equilibrio e le rimanenti all'equilibrio in stato stazionario, la reazione non all'equilibrio è quella che determina il flusso di tutta la via metabolica, perchè questa sola reazione ha spontaneità, ed aumentando l'attività dell'enzima che la catalizza, aumenta la velocità della sintesi del suo prodotto. L'aumento del prodotto sarà subito equilibrato dalla reazione successiva che era in condizioni di equilibrio allo stato stazionario e che tende a ritornarci. Questa reazione trasforma l'aumento di substrato in aumento di prodotto che è a sua volta substrato della reazione successiva, e così avanti (fig. 5-5). La reazione non all'equilibrio è il motore della via metabolica, e per questa sua caratteristica vedremo che è catalizzata da enzimi regolati ed è posta nella sequenza delle reazioni in posizioni opportune a regolare tutta la via.

Se prendiamo in considerazione la variazione di energia libera delle reazioni di una via metabolica, vediamo che la spontaneità in condizioni standard (ΔG°) non è per tutte le reazioni nel verso del flusso metabolico. Alcune reazioni procederebbero in senso inverso al flusso interrompendo così la via metabolica.

La natura ha ovviato a questi blocchi metabolici operando in condizioni diverse da quelle standard, e cioè mantenendo le concentrazioni dei metaboliti cellulari in modo che le reazioni tendano a raggiungere le condizioni di equilibrio nel verso del flusso metabolico, oppure che siano all'equilibrio allo stato stazionario (ss).

Le reazioni all'equilibrio nelle condizioni cellulari sono poi spinte nel verso del flusso metabolico dalla reazione della stessa via metabolica che non è all'equilibrio.

La cellula riesce a mantenere le reazioni non all'equilibrio, rifornendo continuamente la via metabolica del 1° substrato sottraendo continuamente il prodotto di reazione e mantenendo l'attività catalitica dell'enzima che catalizza la reazione non all'equilibrio inferiore a quella degli enzimi che catalizzano le reazioni all'equilibrio (fig. 5-5).

La reazione non all'equilibrio è la reazione limitante il flusso metabolico e mantiene costantemente la (ss) dei reagenti e la (ss) dei prodotti, rispettivamente superiori ed inferiori a quelle di equilibrio. La concentrazione dei reagenti non aumenta progressivamente, nè quella dei prodotti si annulla, perchè esistono dei meccanismi

automatici di controllo che saranno descritti in un prossimo paragrafo.

L'attività catalitica totale dell'enzima che catalizza la reazione non all'equilibrio, è mantenuta inferiore a quella degli enzimi che catalizzano le reazioni all'equilibrio almeno in due modi:

1) La cellula sintetizza un numero minore di molecole di enzima in relazione al numero di turnover dell'enzima stesso. Se l'enzima ha un basso numero di turnover (ogni molecola di enzima catalizza poche reazioni nell'unità di tempo) le molecole di enzima saranno, a parità di condizioni, più di quelle che lo stesso enzima avrebbe se avesse un alto numero di turnover.

L'attività catalitica totale per cellula è calcolata moltiplicando il numero di turnover per la quantità di enzima presente in 1 g di tessuto fresco (integro) e quindi dividendo per il numero di cellule contenute in un gr di T.F. In genere si usa l'attività per gr di T.F. perchè è più pratica per fare comparazioni.

2) Mantenendo l'enzima parzialmente inibito da effettori. Si è osservato che la quasi totalità degli enzimi che catalizzano reazioni fuori dall'equilibrio, sono regolati. La principale funzione di questa regolazione è quella di controllo di tutta la via metabolica, e si ritiene che il meccanismo di regolazione sia costruito in modo da mantenere l'enzima regolato sempre parzialmente inibito e che contribuisca così a mantenere la reazione fuori dall'equilibrio. L'enzima sarebbe completamente disinibito solo quando è richiesta l'attività massima della via metabolica.

I due meccanismi indicati cooperano a limitare l'attività catalitica totale/cellula degli enzimi che catalizzano reazioni non all'equilibrio.

In genere, c'è corrispondenza tra reazione non all'equilibrio ($\Delta G'$ negativo), e attività catalitica per cellula dell'enzima inferiore a quella degli enzimi che catalizzano reazioni all'equilibrio. Tuttavia alcuni dati sperimentali sono in contrasto. Ad esempio, esaminando gli enzimi della glicolisi di alcuni tessuti (tab. 5-1 e 5-2 e fig. 5-2) si osserva che esocinasi e fosfofruttocinasi, aldolasi ed enolasi hanno attività, per g di tessuto fresco, basse rispetto agli altri enzimi; quando solo esocinasi e fosfofruttocinasi catalizzano reazioni non all'equilibrio. Ciò può essere spiegato ammettendo che il dosaggio della aldolasi e della enolasi, per qualche ragione, sottostimi l'attività catalitica che questi enzimi hanno nella cellula. Un'altra spiegazione viene considerando che esocinasi e fosfofruttocinasi sono enzimi regolati, e che nella cellula sono sempre presenti i loro effettori, per cui le attività catalitiche misurate in vitro risultano più alte per l'assenza degli inibitori. Se la fosfofruttocinasi, enzima regolatore di tutta la glicolisi, fosse dosata in presenza dei suoi inibitori cellulari, avrebbe una attività massima molto inferiore a quella dell'aldolasi. Ciò è confermato dal dato che nel muscolo in riposo, il flusso glicolitico è circa $0,05 \mu\text{moli/min/g}$ di tessuto, quindi molto al di sotto dell'attività, misurata in vitro, dei due enzimi (vedere tab. 5-2).

Nel muscolo in contrazione il flusso glicolitico sale a 60 $\mu\text{moli/min/g}$ di tessuto fresco e questo valore è circa quello dell'attività misurata in vitro della fosfofruttocinasi. Nella fibra muscolare in contrazione la reazione opererebbe in condizioni vicine all'equilibrio.

La minore attività esocinastica del muscolo scheletrico, rispetto al muscolo cardiaco ed al tessuto nervoso, può essere messa in relazione al fatto che il muscolo scheletrico in riposo od in contrazione lenta, utilizza relativamente poco glucosio, ed in contrazione rapida utilizza prevalentemente G6P proveniente dal catabolismo del glicogeno.

Un'altra discordanza tra attività enzimatica e reazione non all'equilibrio, è data dalla piruvato cinasi, che ha un'attività catalitica per g di tessuto fresco molto alta. Anche per questo enzima regolato, si assume che, per la presenza degli inibitori fisiologici, l'attività nella cellula sia inferiore a quella dosata in vitro.

Geometria della via metabolica.

Gli enzimi della via metabolica possono essere disposti in vari modi:

1) Distribuiti in soluzione nel citoplasma, nucleoplasma o lisosomi. In questo tipo di via metabolica gli intermedi sono molecole stabili e diffondono dall'enzima che li ha prodotti fino all'enzima in cui sono substrati (es. glicolisi, shunt del G6P). Enzimi in soluzione e quindi diffusibili, si hanno anche per reazioni che coinvolgono substrati che sono macromolecolari (es. sintesi del DNA, sintesi del glicogeno, modificazioni post-traduzionali delle proteine, ecc.) o che sono strutture sopramolecolari (cromatina, membrane, ecc.) che invece non diffondono o diffondono poco. Quindi quando sono necessarie più reazioni si hanno associazioni (e dopo la reazione, le dissociazioni) successive di enzimi sullo stesso substrato macromolecolare.

2) Enzimi riuniti in complessi: gli enzimi sono associati a formare una struttura sopramolecolare. Gli intermedi metabolici sono sempre associati ad una proteina di trasporto che li espone all'azione degli enzimi fino alla liberazione del prodotto (es. sintesi degli acidi grassi). Questo tipo di organizzazione evita la confusione di intermedi con altre vie, ed evita che intermedi molto reattivi vengano coinvolti in reazioni non volute dalla cellula.

3) Gli enzimi possono essere associati a particolari strutture perchè la reazione richiede disposizioni particolari dei reagenti. Esempio: all'interno del ribosoma, la formazione del legame peptidico in relazione al codice genetico; gli enzimi della catena respiratoria che sono inseriti in sequenza ordinata nella membrana mitocondriale interna, al fine di trasferire sui loro cofattori l'H radicale prima e l'elettrone poi, fino all'ossigeno. L'H radicale e l'elettrone sono molto reattivi, se si dissociassero dagli enzimi sarebbero persi perchè reagirebbero con l'acqua o con le strutture cellulari danneggiandole.

Inoltre la fosforilazione dell'ATP, che è accoppiata al trasferimento degli elettroni, chiede che i protoni prodotti dalla catena respiratoria vengano liberati all'esterno della membrana interna mitocondriale. Anche questa è una restrizione che richiede una precisa disposizione di tutti gli enzimi coinvolti nella fosforilazione ossidativa.

Regolazione della via metabolica.

La regolazione da effettore di una via metabolica è costruita per far variare la velocità di sintesi del prodotto finale (PF) in relazione diretta alla velocità di utilizzazione del PF stesso. Questa velocità è in relazione inversa alla variazione della concentrazione allo stato stazionario (C_{ss}) del PF. Il meccanismo di regolazione è molto semplice, se nella cellula il PF viene utilizzato con velocità superiori a quelle della sua sintesi, la C_{ss} di PF diminuisce ed automaticamente la via metabolica sintetizza più velocemente PF; quando l'utilizzazione di PF decresce il meccanismo di regolazione opera in senso contrario.

La regolazione ormonale ha uno spettro di azione più vasto di quella da effettori e può avere azione di regolazione contemporaneamente su una o più vie metaboliche di una stessa cellula e di cellule diverse. L'ormone è un effettore di regolazione intercellulare e condiziona la regolazione da effettore delle cellule su cui agisce.

La regolazione di una via metabolica è condizionata dall'apporto del primo substrato della via metabolica stessa; quando questo è in eccesso, la regolazione può opporsi alla sua utilizzazione in quella determinata via; se esso è carente, la regolazione disinibisce o attiva gli enzimi regolati al fine di utilizzarne maggiori quantità nell'unità di tempo.

Tuttavia, se la carenza del primo substrato è oltre la norma, la regolazione della via metabolica non può ovviare all'inconveniente. Se ciò risulta in una forte carenza di un prodotto finale che è importante per la vita cellulare, si ha la morte della cellula.

Tuttavia la cellula e gli organismi, sono organizzati in modo da evitare carenza dei primi substrati delle vie metaboliche (fig. 5-4).

Uno di questi primi substrati importanti è il glucosio, la cui concentrazione nel sangue è mantenuta entro limiti precisi (nel sangue umano di individuo alimentato, la concentrazione del glucosio è di 5,5 mM, e 4,4 mM dopo un giorno di digiuno, 3,8 mM dopo tre giorni e 3,6 mM dopo 30 giorni di digiuno). La capacità di mantenere entro certi limiti la concentrazione di glucosio nel sangue, conferisce una grande autonomia all'organismo umano, perchè il glucosio è utilizzato da tutte le cellule dell'organismo per produrre energia e per sintetizzare composti. In particolare per il sistema nervoso, che nelle prime ore di digiuno utilizza glucosio al 100%, e dopo un giorno di digiuno utilizza 90% di glucosio e 10% di corpi chetonici. In condizioni normali ci alimentiamo tre volte al giorno, ed il periodo più lungo di digiuno è quello notturno (circa 8 h). Questo periodo è sufficiente per richiedere l'entrata in opera dei meccanismi di regolazione per mantenere entro la norma i valori della glicemia. La piccola caduta di concentrazione di glucosio ematico è responsabile dell'attivazione dei meccanismi automatici di regolazione della glicemia.

Questi meccanismi di regolazione sono operati da effettori e da ormoni e saranno descritti successivamente (cap. 7).

Quando ci alimentiamo la glicemia aumenta fino al massimo fisiologico (circa 5,5 mM), continuando ad alimentarci l'eccesso di glucosio fa liberare nel sangue dal pancreas endocrino, l'insulina, che stimola nel fegato e nel tessuto muscolare la sintesi del glicogeno. Il glucosio in eccesso è così convertito nella sua forma di deposito. Se l'apporto alimentare di glucosio continua, l'eccesso viene convertito in lipidi (trigliceridi nel fegato e tessuto adiposo).

In condizioni di digiuno, la glicemia diminuisce perchè il glucosio è utilizzato dalle cellule dell'organismo, tuttavia il sangue è continuamente rifornito di glucosio in quantità opportune da parte del fegato, altrimenti la glicemia si abbasserebbe rapidamente oltre i valori fisiologici causando coma e poi morte.

L'abbassamento della glicemia fa rilasciare automaticamente

il glucagone dal pancreas endocrino. Il glucagone stimola nel fegato la depolimerizzazione del glicogeno fino a glucosio, che viene liberato nel sangue al fine di mantenere livelli normali di glicemia. In 24 h il glicogeno epatico, che è in totale circa 100 g nell'uomo, è ridotto a 14 g. Per sostenere la glicemia per oltre un giorno, interviene anche un altro meccanismo. Per azione del glucagone, nel fegato viene stimolata una via metabolica detta gluconeogenesi, che converte metaboliti non glucidici (aminoacidi, acido lattico, glicerolo) in glucosio. Il glucosio è liberato nel sangue per alimentare tutti i tessuti.

La gluconeogenesi è attiva già nel digiuno notturno, ed utilizza soprattutto aminoacidi che provengono dalla degradazione inizialmente di proteine epatiche e successivamente muscolari. La perdita di queste proteine è routinariamente rimpiazzata con il pasto del mattino od in quelli successivi. L'organismo umano assicura la costanza della glicemia e quindi l'apporto del 1° metabolita con i seguenti meccanismi:

- 1) Deposito del 1° metabolita (glucosio) come polimero (glicogeno) in un organo (fegato), da utilizzarsi nei momenti di carenza e/o di largo uso del metabolita (es. digiuno o intenso sforzo muscolare) da parte di tutto l'organismo.
- 2) Sintesi del metabolita (gluconeogenesi) in un organo (fegato) da metaboliti diversi (aminoacidi, acido lattico, glicerolo) presenti nell'organo stesso (fegato) o provenienti da altri organi (muscolo scheletrico, tessuto adiposo, globuli rossi, ecc.).
- 3) Risparmio del metabolita (glucosio) utilizzando a suo posto altri metaboliti (acidi grassi e corpi chetonici) per la stessa finalità metabolica: sintesi di ATP).
- 4) L'eccesso del metabolita (glucosio) nel sangue è rimosso convertendolo in polimero di deposito (glicogeno) o trasformandolo in altri composti (trigliceridi).

Il mantenimento della glicemia entro i suoi valori normali, è regolato automaticamente ed indipendentemente dall'azione di due ormoni che agiscono simultaneamente su più vie metaboliche. Le azioni dei due ormoni sono in antagonismo, uno (glucagone) favorisce l'aumento della glicemia, l'altro (insulina) il decremento. I due ormoni sono rilasciati in stati metabolici diversi ed agiscono correggendo le variazioni di glicemia causate dai vari stati metabolici. Il rilascio degli ormoni dalle cellule che li producono è automatico ed in relazione ai bassi livelli (glucagone) ed alti livelli (insulina) di glicemia.

Il livello ematico di altri metaboliti (es. acidi grassi, corpi chetonici) è regolato con meccanismi simili a quelli indicati per il glucosio, anche se non tutti i tipi di meccanismo che regolano la glicemia, partecipano alla regolazione della concentrazione ematica degli altri metaboliti.

Quindi la regolazione del glucosio è la più complessa ma è anche la più conosciuta.

Regolazione di una via metabolica lineare.

La via metabolica lineare (non ramificata) è regolata (fig. 5-5) da un meccanismo che nella sua forma più semplice ha le seguenti caratteristiche:

1) La prima reazione è mantenuta costantemente non all'equilibrio e tende a raggiungerlo nel senso della via metabolica, le altre reazioni sono mantenute all'equilibrio allo stato stazionario, cioè, mentre si ha flusso metabolico, i valori delle concentrazioni dei reagenti e dei prodotti di ogni singola reazione rimangono uguali a quelli che le stesse reazioni avrebbero se fossero all'equilibrio termodinamico.

2) La prima reazione è catalizzata da un enzima regolato, che è inibito dal prodotto finale della via metabolica. L'inibizione può essere vicina al valore del 100% ma non è mai completa. Il flusso metabolico non è mai interrotto. Si assume che il flusso netto diventi zero quando esiste una via metabolica inversa, cioè una via metabolica che, con alcune o tutte reazioni diverse da quelle della via metabolica diretta, converta PF nel primo substrato della via metabolica.

3) L'enzima regolato da effettori è anche regolato da ormoni(i), e quando l'enzima è attivato per azione ormonale, è anche insensibile agli effettori. L'enzima esiste in due forme, una fosforilata ed una non fosforilata. La fosforilazione e defosforilazione dell'enzima sono sotto il controllo ormonale che opera per mezzo di enzimi proteina-cinasi e proteina fosfatasi. Se la via metabolica è degradativa (produce ATP da ADP e/o i coenzimi ridotti NADH, NADPH, FADH₂), la fosforilazione attiva l'enzima regolato, mentre la defosforilazione lo inibisce. Se la via metabolica è sintetica (utilizza ATP e/o coenzimi ridotti e produce in genere composti con massa molecolare maggiore del 1° substrato), la fosforilazione inibisce l'enzima regolato, mentre la defosforilazione lo attiva.

Ad esempio, nell'enzima catalitico glicogeno fosforilasi è la forma fosforilata che è cataliticamente molto attiva ed anche insensibile agli effettori (ai quali invece è sensibile la forma defosforilata, meno attiva).

L'insensibilità agli effettori ha la funzione di rendere l'azione ormonale indipendente dalla regolazione da effettore quando questa potrebbe interferire con l'azione dell'ormone. L'azione attivante dell'ormone sull'enzima regolato porta ad aumentare la CSS-PF, e questa, causando l'inibizione dell'enzima regolato (vedi punto 2), si opporrebbe all'azione ormonale.

L'enzima sintetico glicogeno sintetasi ha il meccanismo molecolare di regolazione opposto a quello dell'enzima glicogeno fosforilasi, la forma fosforilata poco attiva, è sensibile agli effettori, mentre quella non fosforilata è più attiva ed insensibile agli effettori. Questo per evitare che i due enzimi (uno sintetico ed uno catabolico) siano attivati dall'ormone simultaneamente ed il PF sia continuamente e ciclicamente sintetizzato e ritrasformato (vedere dopo, cicli di substrati). Per gli enzimi del metabolismo del glicogeno la forma meno attiva (sia essa fosforilata o no) è quella controllata da effettori,

confermando che per la sintesi di relativamente piccole quantità di PF la regolazione è da effettore, per quantità maggiori è ormonale. Tuttavia questa non è una regola generale: l'enzima epatico piruvato cinasi, controllato da ormoni mediante fosforilazione, ha la forma attiva defosforilata e sensibile agli effettori. Questa eccezione è spiegata dal fatto che l'enzima epatico ha la doppia natura: sintetica e degradativa (vedere cap.7).

4) L'ormone che stimola l'attività di una via metabolica in alcuni tipi di cellula stimola anche il flusso del 1° metabolita dal sangue nella cellula al fine che la via metabolica attivata non sia limitata da un insufficiente apporto del 1° substrato.

Tutte le caratteristiche di una via metabolica e della sua regolazione (sopra indicate) sono schematizzate nella figura 5-5. Lo schema rappresenta una generalizzazione di dati sperimentali ottenuti su vie metaboliche diverse, alcuni aspetti dello schema richiedono un'ulteriore conferma sperimentale.

E' certo che esistono enzimi regolati da effettori che sono anche regolati da ormoni, ma esistono enzimi regolati da effettori, la cui dipendenza dell'attività catalitica (non la sintesi) da ormoni, non è stata ancora provata (es. esocinasi). Anche l'associazione tra reazione non all'equilibrio ed enzimi regolati, ha almeno una eccezione (glutamato deidrogenasi). L'associazione tra reazione all'equilibrio ed altra attività enzimatica massima per g di tessuto, non è verificata per alcuni enzimi (es. aldolasi), e così l'associazione tra bassa attività catalitica massima e reazione non all'equilibrio (es. piruvato cinasi). Tutte queste eccezioni hanno delle spiegazioni (vedere cap. 7), cioè derogare dei canoni di regolazione sopra descritti, è in relazione ad un adattamento metabolico per operare una opportuna regolazione di enzimi posti in posizioni uniche alle intersezioni di vie metaboliche. Lo studio della regolazione del metabolismo permette di osservare che la Natura è molto opportunistica e non ha paura a fare eccezioni: se esse sono utili alla vita cellulare le seleziona positivamente.

Analizziamo le tre condizioni di stato di regolazione della via metabolica schematizzata nella figura 5-5:

1) Si assume che la concentrazione allo stato stazionario di PF (Css-PF) sia al suo massimo fisiologico ed inibisca più del 90% dell'attività dell'enzima regolato (Er).

Questo stato si realizza quando il PF è utilizzato con bassa velocità. Con un'alta Css-PF, un alto numero di molecole di PF è costantemente associato al sito di regolazione di Er e quindi un alto numero di molecole di enzima (oltre il 90% di quelle presenti nella cellula) è sempre inibito.

Il primo metabolita A, pur non essendo utilizzato dalla via metabolica, non si accumula nella cellula perchè può fluire all'esterno di essa (e/o essere utilizzato in altre vie).

Quando il PF comincia ad essere utilizzato (o allontanato) più velocemente dalla cellula, la sua Css diminuirà causando la dissociazione dei complessi PF-Er, incrementando così la concentrazione di Er libero che è cataliticamente attivo.

Con la stessa rapidità con cui avviene l'abbassamento della Css-PF e proporzionalmente alla sua riduzione, si ha

l'aumento dell'attività catalitica di Er. Nello schema di fig. 5-5 si assume che, se la C_{ss}-PF passa al suo valore fisiologico minimo, l'attività catalitica di Er aumenti fino a portare il valore di V_i al 50% della V_i massima (2 in fig. 5-5) e che le oscillazioni della C_{ss}-PF, entro i suoi valori fisiologici massimi e minimi, facciano variare la V_i della prima reazione tra i valori indicati con 1 e 2 (rispettivamente 10% e 50% della V_i massima).

L'incremento di velocità della prima reazione farà aumentare la C_{ss} dell'intermedio B da 1 a 2, che a sua volta fa aumentare la velocità della seconda reazione enzimatica da 1 a 2 (dal 10% al 50% della V_i massima di questa reazione).

L'aumento della velocità della seconda reazione è in relazione diretta con l'incremento della C_{ss}-B e quindi con l'incremento dell'attività catalitica di Er.

Essendo la velocità della seconda reazione regolata dalla C_{ss} del suo substrato B, risulta regolata anch'essa dall'enzima Er, e la sua velocità si aggiusterà automaticamente e con un meccanismo molto semplice, con quella della prima reazione. Abbiamo visto che se la C_{ss}-B aumenta, anche la velocità della seconda reazione aumenta in conseguenza, e tenderà ad abbassare la C_{ss}-B. Se la C_{ss}-B si abbassa, anche la velocità della sua conversione in C (2^a reazione) diminuisce. Quindi una ridotta sintesi di B causa automaticamente una riduzione della sua utilizzazione. Nelle primissime fasi dei cambiamenti del flusso metabolico ci possono essere delle oscillazioni della C_{ss}-B fino a che essa si stabilizza, in modo che la velocità della seconda reazione sia uguale a quella della prima. Sappiamo che l'attività catalitica massima per cellula di E1 è superiore a quella di Er, tuttavia l'attività catalitica di E1 si aggiusta fino ad essere uguale a quella di Er, perchè l'attività di E1 (non essendo un enzima regolato) è regolata solo dalla C_{ss}-B (suo substrato), che è controllata volta dall'attività di Er. La maggiore attività catalitica totale per cellula di E1 rispetto ad Er rende solo più pronti gli aggiustamenti della velocità della 2^a reazione in relazione alle variazioni di velocità della 1^a, tuttavia la velocità della 2^a reazione non può superare quella della 1^a se non per tempi brevissimi. Se B viene convertito in C più rapidamente di quanto sia prodotto, la velocità della 2^a reazione è destinata a rallentare per carenza di substrato. La C_{ss}-B si abbasserà fino a quando la velocità della reazione catalizzata da E1 eguaglierà quella della reazione catalizzata da Er.

Le considerazioni fatte sopra per la 2^a reazione sono valide anche per quelle ad essa seguenti, per cui tutte le reazioni all'equilibrio allo stato stazionario, essendo catalizzate da enzimi regolati solo dalla concentrazione del loro substrato, aggiusteranno la velocità incrementandola o riducendola rapidamente, fino al valore della 1^a reazione, e di pari entità sarà incrementata o ridotta la velocità di sintesi del PF. Se la velocità di sintesi del PF è superiore a quella della sua utilizzazione, la C_{ss}-PF aumenterà e ciò causerà una inibizione di Er e quindi un rallentamento della sintesi di PF. A sua volta se la C_{ss}-PF si abbassa perchè prodotta insufficientemente in relazione alla sua utilizzazione, l'inibizione di Er sarà parzialmente rimossa fino a che la C_{ss}-PF sarà tale da determinare una velocità di sintesi dello stesso PF uguale a quella della sua utilizzazione.

La via metabolica e la sua regolazione sono costruite in modo che la C_{ss}-PF sia continuamente aggiustata al fine di avere la velocità di sintesi di PF uguale a quella della sua utilizzazione, qualsiasi sia il destino metabolico di PF : utilizzato in un'altra via metabolica della stessa cellula in cui è sintetizzato, od esportato dalla cellula nel sangue per essere utilizzato da altre cellule dello stesso organismo.

La regolazione da effettori della via metabolica essendo dipendente dal valore della C_{ss} del prodotto finale, ha anche un'altra proprietà: limitare la sintesi di PF quando PF è prodotto da un'altra via metabolica della stessa cellula o è importato nella cellula dal sistema circolatorio (es. PF può provenire dagli alimenti). Il sistema di regolazione è costruito in modo che la velocità di sintesi di PF rallenti quando la C_{ss}-PF aumenta, e ciò è indipendente dalle cause che inducono l'aumento (vedere figg. 5-5a,f).

Queste cause possono essere: maggiore velocità di sintesi di PF rispetto alla velocità della sua utilizzazione, immissione di PF nella cellula con una velocità che sommata alla velocità di sintesi endogena di PF, risulta superiore alla velocità di utilizzazione di PF. Quando il PF è esportato dalle cellule che lo sintetizzano il meccanismo di regolazione da effettore può rispondere alle esigenze di utilizzazione di PF da parte dell'organismo se queste sono di limitata entità, quando l'utilizzazione di PF è tale che la C_{ss}-PF ematica si riduce oltre certi valori interviene il meccanismo ormonale di regolazione della via metabolica (vedere dopo e figg. 5-5a,f).

Anche la C_{ss}-A può avere delle oscillazioni e l'attività di Er avrà delle oscillazioni che faranno variare la velocità della 1^a reazione, tuttavia queste oscillazioni di velocità saranno compensate dal meccanismo di regolazione da effettore. Se la C_{ss}-A si abbassa e di conseguenza la velocità della 1^a reazione decresce, viene prodotto meno PF; se l'utilizzazione di PF rimane costante, la C_{ss}-PF decresce e viene così rimossa l'inibizione da un certo numero di molecole di Er. Ciò risulta in un incremento dell'attività di Er che compensa la riduzione di attività catalitica provocata dalla riduzione delle C_{ss}-A. Se invece le C_{ss}-A

aumenta, viene prodotto più velocemente il PF, la sua C_{ss} aumenterà e di conseguenza aumenterà la quantità di Er inibita. Ciò causerà un rallentamento della attività di Er e la velocità della prima reazione diminuirà per azione del meccanismo degli aggiustamenti reversibili sopra indicato. Il meccanismo di regolazione da effetto si oppone o compensa tutte le variazioni della velocità di sintesi di PF che non tendono ad uguagliarla alla velocità di utilizzazione di PF.

In figura sono indicati i grafici V_i in funzione della $[S]$ al fine di collegarsi con i valori di attività degli enzimi dosati in vitro, tuttavia nelle cellule le condizioni di V_i (velocità misurata in assenza di prodotti di reazione) non sono presenti perchè, data la struttura della via metabolica, i reagenti ed i prodotti di ogni reazione, sono sempre presenti. Ciò vuol dire che le velocità cellulari sono inferiori a quelle misurate in condizioni di V_i . Inoltre, una forte utilizzazione di PF, oltre a determinare una riduzione dell'inibizione di Er, può favorire un incremento del flusso metabolico per sottrazione di prodotto di reazione. Diminuendo la C_{ss} -PF la reazione catalizzata da E₁ sarà favorita, e così avanti fino alla prima reazione. Se presente, il contributo è piccolo perchè la C_{ss} -PF varia di poco. Il punto 2 di figura indica le condizioni della velocità pari alla metà della velocità massima. Si assume che per gli enzimi non regolati questa condizione corrisponda a quelle cellulari, perchè il $\frac{1}{2} V_{max}$ è il maggiore valore di velocità a cui è associata la maggiore variazione della V_i per oscillazioni della concentrazione del substrato. Secondo questa ipotesi la concentrazione cellulare del substrato avrebbe il valore della K_m . Per molti enzimi i dati sperimentali concordano con questa ipotesi.

Regolazione della via metabolica lineare per azione degli ormoni.

In condizioni metaboliche in cui viene rilasciato l'ormone-1 nel sangue, l'enzima Er risulta fosforilato ed attivato al massimo, ed ha una curva della $V_i/[S]$ iperbolica (3 in fig. 5-5a). La regolazione ormonale degli enzimi avviene per mezzo di un meccanismo molecolare che include il recettore per l'ormone, enzimi proteina-cinasi e proteina fosfatasi che fosforilano e defosforilano altri enzimi, ed altre proteine. Il meccanismo ormonale di attivazione degli enzimi già presenti nella cellula, è descritto in fig. 7-9. L'attivazione ormonale di Er incrementa il flusso metabolico al suo massimo, portando la velocità della 1^a reazione a circa il 90% della sua velocità massima, anche quando la C_{ss} -A rimane costante. L'incremento di sintesi di B incrementerà la C_{ss} -B e così anche quella degli altri metaboliti intermedi, PF incluso. Gli incrementi della C_{ss} dei vari metaboliti (indicati con 3 nella fig. 5-5), risulteranno in incrementi delle velocità delle reazioni, e ciò risulterà in un incremento della

sintesi di PF, la cui Css potrà aumentare fino ai limiti fisiologici massimi per favorire l'aumento di utilizzazione (o di esportazione della cellula di PF) in risposta al comando dato dall'ormone.

L'aumento di Css-PF è anche il segnale cellulare di regolazione da effettore indicante che la sintesi di PF deve essere rallentata; tuttavia Er-fosforilato (la forma enzimatica attivata dell'azione ormonale) è insensibile al PF.

Questa insensibilità all'inibizione da PF è opportuna perché rende l'azione dell'ormone indipendente dal meccanismo di regolazione da effettore, che è un meccanismo di regolazione che risponde alle variazioni cellulari di Css-PF. Se Er-fosforilato fosse sensibile all'inibizione da PF, l'azione attivante dell'ormone-1 verrebbe limitata.

Poiché gli ormoni hanno la funzione di coordinare tra loro più organi, hanno la capacità di regolare le vie metaboliche di organi diversi e di operare la loro regolazione anche quando i segnali cellulari (effettori) favorirebbero un altro metabolismo. Le esigenze di PF da parte dell'organismo (cioè di organi e tessuti costituiti da cellule che utilizzano PF come substrato per le proprie vie metaboliche, ma che non posseggono la via metabolica per sintetizzare PF) che sono segnalate dalla maggiore (o minore) presenza di ormone nel sangue, devono avere la possibilità di prevalere sulle esigenze metaboliche di un determinato tessuto (costituito da cellule capaci di sintetizzare PF). Quando le cellule di un tessuto passano dalla condizione di produrre un determinato composto solo per le proprie esigenze metaboliche alla condizione di produrlo in grandi quantità per altre cellule dello stesso organismo, devono compiere due cambiamenti simultanei: produrre una maggiore quantità di composto, e contemporaneamente svincolarsi dal sistema di regolazione cellulare che è costruita per regolare le quantità del composto sufficienti per le minori esigenze della cellula che sintetizza PF.

Alcuni ormoni, oltre ad attivare l'enzima regolato, possono far aumentare la velocità di trasporto dal sangue alla cellula del 1° metabolita A, al fine di evitare che l'attivazione di Er sia limitata da un insufficiente apporto di A.

Per operare l'incremento di trasporto di A, l'ormone, legandosi al proprio recettore, oltre ad attivare la fosforilazione di Er per azione di altre proteine, attiva un complesso di proteine di membrana che ha la funzione di trasportare il 1° metabolita della via metabolica all'interno della cellula.

L'entità dell'attivazione ormonale è regolata dalla Css-ormone-1 nel sangue, che dipende a sua volta dalla durata degli stimoli che causano il rilascio dell'ormone nel sangue (basse Css-PF). La condizione 3 di fig. 5-5a mostra il massimo di attivazione ormonale in cui la quasi totalità di Er è nella forma fosforilata, tuttavia si può verificare che le due forme di Er coesistano in proporzioni diverse. Se ad esempio Er-fosforilato ed Er-defosforilato sono ambedue presenti in proporzione del 50%, solo Er-defosforilato sarà inibito da PF e quindi sarà regolato dalle fluttuazioni della Css-PF. In questo modo i due sistemi di regolazione,

ormonale e da effettore, possono coesistere e cooperare. La regolazione da effettore tenderà a ridurre le oscillazioni di C_{ss}-PF, in risposta a variazioni di utilizzazione di PF da parte delle cellule che lo producono, e la regolazione ormonale in risposta a variazioni della C_{ss}-PF ematica e cioè dell'utilizzazione di PF da parte di altre cellule dell'organismo (vedere figg.5-5 a,f).

Er-fosforilato è continuamente defosforilato per azione di una proteina fosfatasi. Se non persiste lo stimolo che ha indotto la secrezione dell'ormone-1 (bassa C_{ss}-PF nel sangue), la C_{ss}-ormone-1 nel sangue diminuisce per inattivazione dell'ormone (per azione di specifici enzimi (di cellule epatiche, polmonari e di altri organi).

L'abbassamento della C_{ss}-ormone-1 nel sangue per equilibrio, causa la dissociazione dei complessi ormone-1-recettore e quindi l'inattivazione della proteina cinasi che fosforila Er. La proteina fosfatasi opera la riconversione di Er nella forma non-fosforilata (meno attiva). La riconversione di Er può essere accelerata dall'ormone-2 che stimola l'attività della Er-fosfatasi (l'ormone-2 viene rilasciato nel sangue quando la C_{ss}-PF ematica è alta. Gli ormoni 1 e 2 sono antagonisti e vengono secreti in condizioni metaboliche diverse, rispettivamente bassa ed alta C_{ss}-PF (vedere figg.5-5a,f).

Regolazione da effettori delle vie metaboliche ramificate.

Le vie metaboliche ramificate divergenti producono più di un prodotto finale e per questo hanno più di un enzima regolato, al fine di dirigere opportunamente il flusso metabolico verso la sintesi dei due o più PF.

Il meccanismo molecolare di regolazione delle vie ramificate è costruito in modo che uno solo di tutti gli enzimi regolati sia il regolatore di tutta la via metabolica. Questo enzima è detto "pace maker" (fattore dell'entità del flusso metabolico). Dall'enzima "pace maker" dipendono sia le reazioni all'equilibrio catalizzate dagli enzimi non regolati, sia le reazioni non all'equilibrio catalizzate da enzimi regolati (fig. 5-6a,b).

Le vie metaboliche convergenti (fig. 5-6c,d) hanno più metaboliti "primo substrato" che sono convertiti in un unico PF. Il meccanismo di regolazione di queste vie è costruito per regolare la sintesi di PF utilizzando indistintamente i due primi substrati (fig. 5-6c) o preferenzialmente uno di essi (fig. 5-6d). Anche per queste vie occorre più di un enzima regolato, uno dei quali è il "pace maker" (PM) della via.

In alcune vie ramificate, il PM non catalizza la prima reazione ma reazioni successive. In queste vie metaboliche, la prima e le altre reazioni, anche se catalizzate da enzimi regolati, dipendono anch'esse dall'azione di regolazione del pace-maker (fig. 5-6b,c,d).

Regolazione dei cicli metabolici.

Le vie metaboliche costituite da una serie di reazioni in cui il substrato (principale) della prima è anche il prodotto dell'ultima formano un ciclo metabolico. La regolazione dei cicli metabolici è particolare perchè, oltre alla regolazione da effettori su uno o più enzimi del ciclo, include la regolazione della C_{ss} dei metaboliti del ciclo (che è assente nelle vie metaboliche lineari, ramificate e nei cicli di 2-3 reazioni) e che è operata da reazioni non appartenenti al ciclo stesso (fig. 5-6e).

La prima reazione del ciclo metabolico è sintetica ed ha come substrati un intermedio del ciclo (A in fig. 5-6e) ed un altro metabolita, Q; il prodotto della reazione (2° intermedio del ciclo) seguendo le reazioni del ciclo stesso, verrà trasformato liberando uno o più prodotti (in figura uno solo) e ritornando poi ad essere il substrato della prima reazione. Quindi le C_{ss} degli intermedi del ciclo (A, B, C, D, E di fig. 5-6e) non cambiano perchè gli intermedi vengono trasformati l'uno nell'altro, come in ogni altra via metabolica, ma essendo essi in un ciclo, vengono riformati al termine del ciclo in cui sono impegnati, svolgendo una funzione di tipo catalitico.

I cicli metabolici hanno almeno un enzima regolato dal PF del ciclo, tuttavia questa regolazione può essere limitata dalla disponibilità di metaboliti intermedi del ciclo e cioè dalla C_{ss} di questi metaboliti che non può variare, variando solamente l'attività degli enzimi del ciclo. Questa regolazione è attuata mediante reazioni che portano alla sintesi di un intermedio del ciclo (in fig. 5-6e è la reazione da P ad A).

Queste reazioni sono dette anaplerotiche (di riempimento), e sebbene sintetizzino un solo intermedio, fanno aumentare la C_{ss} di tutti gli intermedi del ciclo essendo essi convertibili l'uno nell'altro.

Il decremento delle C_{ss} degli intermedi del ciclo è operato da reazioni che sottraggono un intermedio del ciclo convertendolo in un altro composto che può essere facilmente esportato dalla cellula e/o accumulato (in fig. 5-6e, è la reazione da A a T). La funzione del ciclo è la sintesi di un PF, e ad essa può essere associata la sintesi di un secondo PF con caratteristiche di metabolita di deposito.

Regolazione delle vie metaboliche che contengono cicli di substrati.

La regolazione di vie metaboliche che contengono cicli di substrati, è stata proposta per spiegare incrementi di velocità di sintesi di PF che siano 1000 volte superiori alla velocità basale di sintesi di PF (fig. 5-7). Si assume che il forte incremento di velocità si realizzi per attivazione del ciclo di substrati e che questo incremento non si potrebbe realizzare con la sola attivazione degli enzimi regolati ad opera degli effettori. Questo tipo di regolazione richiede ulteriori prove sperimentali, tuttavia è la migliore ipotesi sul ruolo dei cicli di substrati, ed è stata proposta per spiegare l'attivazione della glicolisi nelle contrazioni muscolari veloci (fig. 7-23).

I cicli di substrati sono costituiti da due reazioni in cui un prodotto dell'una è substrato dell'altra. Le due reazioni sono ambedue non all'equilibrio, che tendono a raggiungere una nel senso della via metabolica, l'altra nel senso opposto.

I cicli di substrati sono detti anche "cicli futili", perchè in passato si riteneva che non avessero una funzione specifica se non quella di riconvertire in substrato il prodotto di una reazione non all'equilibrio, e che se non fossero stati controllati avrebbero creato solo un dispendio di energia (idrolisi dell'ATP) liberata dalla cellula come calore.

Per la regolazione di tutte le vie metaboliche indicate nella figura 5-6 e 5-7, valgono le stesse considerazioni fatte per la regolazione della via metabolica lineare di fig 5-5. L'analisi comparativa degli schemi delle figg. 5-5+5-7, mostra che la posizione nella via metabolica delle reazioni catalizzate dagli enzimi regolati, in particolare quella catalizzata dal PM, associata all'azione negativa dell'effettore, sono le caratteristiche fondamentali del meccanismo di regolazione della via metabolica. Quando la via utilizza più di un 1° substrato e produce più di un prodotto finale, il sistema di regolazione può stabilire il substrato preferenziale ed il prodotto finale principale. Il PM è inibito dal PF, perchè la velocità della via metabolica (che dipende dall'attività catalitica di PM) deve dipendere dalla C_{ss}-PF, che a sua volta dipende dai valori relativi della velocità di sintesi e di utilizzazione di PF (conversione in altri intermedi o esportazione della cellula).

Poichè i meccanismi di regolazione delle vie metaboliche adattano la velocità di sintesi alla velocità di utilizzazione di PF, se ne deduce che:

"la via metabolica e la sua regolazione sono costruite per rispondere congruamente alle richieste di utilizzazione del prodotto finale".

Il metabolismo cellulare è una rete di reazioni collegate, e la distinzione di metaboliti intermedi da prodotti finali, può apparire in taluni casi arbitraria. In genere viene considerato prodotto finale un metabolita cellulare che ha una specifica funzione (es. ATP, trigliceridi di deposito, glicogeno) o che può seguire vie metaboliche diverse (es.

gli acidi grassi che sono convertibili in acetil-CoA o in trigliceridi). Spesso associata a queste caratteristiche c'è quella che il PF è regolatore allosterico (es. ATP, acil-CoA) della propria sintesi.

Individuato il PF è individuata anche la sua via di sintesi. Le condizioni metaboliche possono modificare (in genere per azione della regolazione ormonale) il substrato iniziale e/o quello finale della via metabolica, allungandola o riducendola. Ad esempio, nel muscolo scheletrico a riposo, la glicolisi è aerobica, inizia dal glucosio proveniente dal sangue e finisce in CO_2 , H_2O ed ATP, mentre nello stesso muscolo che si contrae rapidamente la glicolisi è anaerobica, inizia da glicogeno presente nelle fibre che si contraggono e termina in acido lattico ed ATP. Tuttavia la divisione in vie metaboliche scaturisce anche dalla nostra incapacità a visualizzare tutto il complesso delle reazioni e della loro regolazione, che costituiscono il metabolismo cellulare e la sua regolazione.

Regolazione delle vie metaboliche per variazione della concentrazione cellulare degli enzimi.

Variando la concentrazione degli enzimi di una via metabolica si hanno variazioni di flusso metabolico perchè viene variata l'attività catalitica totale degli enzimi nella cellula.

Tuttavia è sufficiente variare la concentrazione dell'enzima PM per avere variazioni nella velocità di sintesi del PF. Infatti ad un incremento della concentrazione del PM, corrisponde un incremento della sua attività catalitica. Inoltre, la presenza di un numero maggiore di molecole di PM è anche meno sensibile all'effetto inibitorio del PF a parità di concentrazioni di PF. Aumentando la concentrazione di PM, sono necessarie C_{ss}-PF maggiori per avere gli stessi valori percentuali di inibizione dell'enzima. La variazione della concentrazione di un enzima richiede ore o giorni per essere apprezzato almeno sperimentalmente, e questi tempi sono lunghissimi se comparati con la regolazione da effettore e da ormone su enzimi già presenti nella cellula. Infatti, la regolazione delle vie metaboliche per variazione della concentrazione degli enzimi, viene definita come "adattamento della via metabolica" perchè risulta da condizioni metaboliche (digiuno, particolari diete, attività muscolare) protratte nel tempo.

In genere la variazione di concentrazione interessa tutti gli enzimi di una via metabolica, ma per molte vie metaboliche si è visto che la concentrazione che varia per prima è quella degli enzimi regolati. Molti enzimi regolati hanno turnover (ricambio) più rapidi degli enzimi non regolati, anche in conseguenza del minor numero di molecole presenti nella cellula. Quindi un rallentamento della sintesi di tutti gli enzimi di una via metabolica, porta ad un decadimento più veloce degli enzimi regolati rispetto a quelli non regolati, perchè i primi hanno velocità di degradazione superiori. Ciò risulta utile ai fini dell'adattamento della via metabolica alle nuove condizioni metaboliche, perchè anche variando solamente l'attività

dell'enzima regolato, si fa variare la velocità di tutta la via metabolica. Anche se la concentrazione degli enzimi non regolati rimanesse costante, l'adattamento della via metabolica si realizzerebbe ugualmente, per cui la riduzione della concentrazione degli enzimi non regolati appare come una azione di economia cellulare, al fine di eliminare molecole inutili ed avere spazio (acqua) a disposizione per mantenere in soluzione altre molecole utili neosintetizzate. La degradazione degli enzimi avviene in genere per azione di proteasi non specifiche e la sensibilità a queste proteasi può essere diversa da enzima a enzima. Quindi è sufficiente ridurre la velocità di sintesi degli enzimi per far sì che la loro concentrazione nella cellula decresca automaticamente e con velocità che è in relazione al numero di molecole di enzima presenti nella cellula stessa ed alla sensibilità alle proteasi cellulari della molecola enzimatica. Esistono proteasi specifiche per singole specie molecolari di enzima e sistemi proteolitici ATP dipendenti che possono essere attivati in particolari condizioni metaboliche.

La presenza di proteasi cellulari non regolate causa un continuo turnover (ricambio) degli enzimi, per cui anche le concentrazioni degli enzimi nella cellula sono allo stato stazionario con un turnover che in genere è più lento degli intermedi metabolici. Questo turnover degli enzimi costa energia, perchè elimina continuamente molecole ancora biologicamente attive, tuttavia esso svolge l'importante funzione di adattare le concentrazioni degli enzimi alle esigenze metaboliche.

Se l'adattamento metabolico richiede un incremento della C_{ss} di alcuni enzimi, viene indotta o incrementata la loro sintesi, e ciò fa aumentare la loro concentrazione cellulare. In genere lo stimolo della sintesi dell'enzima è in risposta all'azione dell'ormone che viene liberato nel sangue in una specifica condizione metabolica.

Più a lungo durerà la condizione metabolica (es. digiuno, alimentazione, allenamento) più a lungo durerà lo stimolo al rilascio dell'ormone, più lunga sarà la presenza dell'ormone nel sangue, più a lungo dureranno gli effetti dell'ormone sulla cellula bersaglio, e tutto ciò risulterà in un maggiore incremento della concentrazione dell'enzima.

In genere l'adattamento di una via metabolica inizia quando la via stessa è costretta a produrre il PF con velocità che sono ai limiti alti od ai limiti bassi della sua velocità metabolica. Nel primo caso gli enzimi si trovano costantemente saturati dai propri substrati e poichè si ritiene che il complesso ES sia più resistente alle proteasi, la C_{ss} dell'enzima tenderà a salire perchè l'enzima è degradato più lentamente e sintetizzato più velocemente.

Nel secondo caso, la via metabolica ha un corredo di enzimi con concentrazioni superiori a quelle occorrenti per il flusso metabolico del momento. La maggior parte delle molecole degli enzimi della via metabolica saranno principalmente nella forma libera (non associata ad S) e ciò favorirà l'attacco delle proteasi alle loro molecole, favorendo un più rapido decadimento della concentrazione di questi enzimi, anche perchè sintetizzati in minore quantità.

Tuttavia, la protezione contro le proteasi operata dal substrato quando è legato all'enzima è stata osservata in vitro, e tuttora è discusso se avvenga anche in vivo. Il substrato mantiene stabile la struttura terziaria dell'enzima evitando la denaturazione dello stesso. Le proteine denaturate o parzialmente denaturate, sono più sensibili alle proteasi.

L'azione delle proteasi specifiche può richiedere energia che è fornita dall'ATP ed esse hanno particolari meccanismi di regolazione che le fa agire in definite condizioni metaboliche ed in risposta all'azione di alcuni ormoni.

Tab. 5-1

Variazione dell'energia libera delle reazioni della glicolisi in condizioni standard (ΔG°) e nelle condizioni cellulari ($\Delta G'$).

Il ΔG° è la variazione di energia libera standard espressa in kcal/mole, con $T = 298$, tenendo costante la $[H^+]$ ed uguale a 10^{-7} . La condizione di $[H^+]$ costante è indicata con '. I $\Delta G'$ sono stati calcolati dalle concentrazioni dei metaboliti presenti nei globuli rossi umani.

La somma algebrica dei ΔG° e dei $\Delta G'$ delle singole reazioni, da rispettivamente il valore del ΔG° e del $\Delta G'$ della glicolisi. Nelle somme sono inclusi i valori del ΔG° e $\Delta G'$ della reazione triosofosfato-isomerasi. Considerando la glicolisi senza questa reazione, si ottiene un $\Delta G' = -17,27$ kcal/mole.

Confrontando la seconda colonna da sinistra con la terza, si osserva che il valore del $\Delta G'$ della glicolisi è circa uguale alla somma dei valori delle tre reazioni non all'equilibrio. Le altre reazioni hanno $\Delta G'$ vicini allo zero, essendo all'equilibrio o vicine ad esso.

In condizioni standard il ΔG° della glicolisi è fortemente negativo, tuttavia la glicolisi non potrebbe procedere a causa del forte ΔG° positivo dell'aldolasi.

La spontaneità di una via metabolica non è data solo dal valore del suo $\Delta G'$, ma è anche necessario che ognuna delle sue reazioni sia all'equilibrio, oppure non all'equilibrio e tenda a raggiungerlo nel verso della sintesi del prodotto finale.

Tab. 5-1

		$\Delta G^{\circ'}$	$\Delta G'$	$\Delta G'$
1	Esocinasi	-5.1	-8.0	-8.0
2	Fosfogluco isomerasi	+0.5	-0.61	
3	Fosfofrutto cinasi	-4.2	-5.3	-5.3
4	Aldolasi	+5.51	-0.29	
5	Triosofofato isomerasi	+1.83	+0.59	
6	Gliceraldeide 3P deidrogenasi	-3.25	+0.37	
7	Fosfoglicerato cinasi			
8	Fosfoglicerato mutasi	+1.06	+0.18	
9	Enolasi	-0.64	-0.80	
10	Piruvato cinasi	-6.1	-4.0	-4.0
11	Lattico deidrogenasi	-6.0	0	
	totale KCal/mole	-16.39	-17.86	-17.30

Attività catalitica degli enzimi della glicolisi di tessuti diversi (da Regulation in Metabolism, E.A. Newsholme e C. Start, 1974. Wiley, Londra).

a) Sono indicate le attività massime degli enzimi che sono espresse in $\mu\text{moli/min/g T.F.}$

I valori mostrano come il tessuto muscolare abbia, rispetto ai tessuti considerati, la maggiore potenzialità glicolitica a partire dalla 2a reazione. Infatti, il muscolo scheletrico svolge la sua attività glicolitica massima in anaerobiosi, utilizzando il glucoso-6-P proveniente dal glicogeno e poco quello ematico, per cui ha relativamente al muscolo cardiaco ed al tessuto nervoso, meno attività esocinastica.

Il cuore, che opera sempre in aerobiosi, utilizza il glucosio ematico più del muscolo scheletrico, ma meno del tessuto nervoso, per cui ha l'attività esocinastica intermedia tra questi due. Il cuore, a differenza del tessuto nervoso, utilizza normalmente acidi grassi e corpi chetonici, e da ciò la minore esigenza di glucosio ematico. Il tessuto nervoso non utilizza acidi grassi ematici perché essi non passano la barriera emato-encefalica, e può utilizzare piccole quantità di corpi chetonici dopo 18 ore di digiuno.

b) Sono indicate le attività catalitiche relative degli enzimi della glicolisi dando valore 1 alla esocinasi di ogni singolo tessuto.

In questa tabella risulta chiaro che l'andamento delle attività enzimatiche è molto simile in tutti i tessuti. Gli enzimi con bassa attività sono l'esocinasi, la fosfofruttocinasi, l'aldolasi e l'enolasi. Le differenze sono più attenuate nel muscolo scheletrico (per altre spiegazioni vedere il testo).

c) Sono indicate le attività catalitiche relative degli enzimi della glicolisi dando valore 100 alla fosfofruttocinasi di ogni singolo tessuto.

Avendo preso come base la fosfofruttocinasi, risulta più chiara la potenzialità glicolitica dei singoli organi essendo l'enzima il pace-maker della glicolisi. Inoltre, a differenza delle esocinasi, la sua attività è indipendente dal substrato, glucosio o glicogeno, più utilizzato da un determinato organo.

Il muscolo cardiaco ha un alto valore di attività lattico deidrogenasica perché, pur essendo altamente aerobico, utilizza la reazione in senso inverso al fine di utilizzare l'acido lattico come combustibile.

Tab. 5-2

(a)

		Attività catalitica massima			
		tessuto nervoso	muscolo cardiaco	muscolo scheletr.	eritro- citi
1	Esocinasi	17	7	1.5	0.3
2	Fosfogluco isomerasi	80	65	176	5.6
3	Fosfofrutto cinasi	24	14	56	1.8
4	Aldolasi	15	24	78	0.7
5	Triosofosfato isomerasi	415	580	2650	97
6	Glicer aldeide 3P-deidrogenasi	105	135	440	17.1
7	Fosfoglicerato cinasi	610	74	169	25.6
8	Fosfoglicerato mutasi	122	27	100	8.6
9	Enolasi	47	15	158	1.6
10	Piruvato cinasi	164	145	387	4.6
11	Lattico deidrogenasi	100	386	366	20.6

Tab. 5-2

(b)

		Attività catalitica relativa			
		tessuto nervoso	muscolo cardiaco	muscolo scheletr.	eritrociti
1	Esocinasi	1	1	1	1
2	Fosfogluco isomerasi	5	9	117	19
3	Fosfofrutto cinasi	2	2	37	6
4	Aldolasi	1	4	52	2.5
5	Triosofosfato isomerasi	28	83	1768	323
6	Gliceraldeide 3P deidrogenasi	7	19	295	57
7	Fosfoglicerato cinasi	41	10	113	85
8	Fosfoglicerato mutasi	8	3	67	28
9	Enolasi	3	2	105	5
10	Piruvato cinasi	11	21	258	15
11	Lattico deidrogenasi	7	55	244	67

Tab. 5-2

(C)

		Attività catalitica relativa			
		tessuto nervoso	muscolo cardiaco	muscolo scheletr.	eritrociti
1	Esocinasi	71	50	2.7	17
2	Fosfoglucoisomerasi	333	464	314	311
3	Fosfofrutto cinasi	100	100	100	100
4	Aldolasi	62	171	139	39
5	Triosofostato isomerasi	1729	4142	4732	5389
6	Gliceraldeide deidrogenasi	437	964	786	950
7	Fosfoglicerato cinasi	2542	507	302	1422
8	Fosfoglicerato mutasi	508	193	179	478
9	Enolasi	196	107	282	89
10	Piruvato cinasi	683	1036	691	256
11	Lattico deidrogenasi	416	1608	654	1144

Fig. 5-1

Schema della via metabolica.

a) Le frecce indicano le reazioni catalizzate dagli enzimi (E_1 , E_2 , E_3 , E_4). A = 1° metabolita; B,C,D = intermedi metabolici; PF = prodotto finale. B,C,D,PF sono derivati dalla struttura covalente di A. L,M,N,O,P,Q sono metaboliti substrati o prodotti coinvolti in una sola reazione della via.

In tratteggio sono indicate le reazioni non catalizzate, termodinamicamente possibili nelle condizioni cellulari; con le lettere minuscole sono indicati i loro prodotti di reazione. Si assume che queste reazioni avvengano raramente nella cellula.

b) Via metabolica ramificata. L'intermedio B può seguire due vie e contribuire alla sintesi di due distinti prodotti finali. Per avere un opportuno dosaggio delle quantità di B che alimentano i due rami della via metabolica, occorre che almeno E_2 e/o E_4 siano regolati.

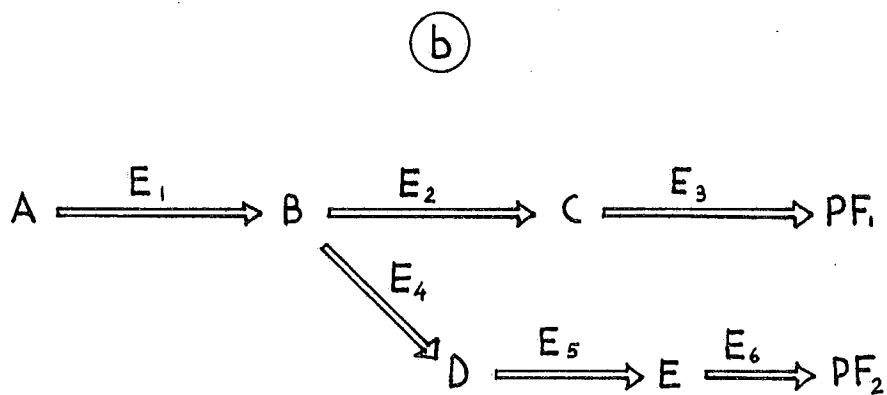
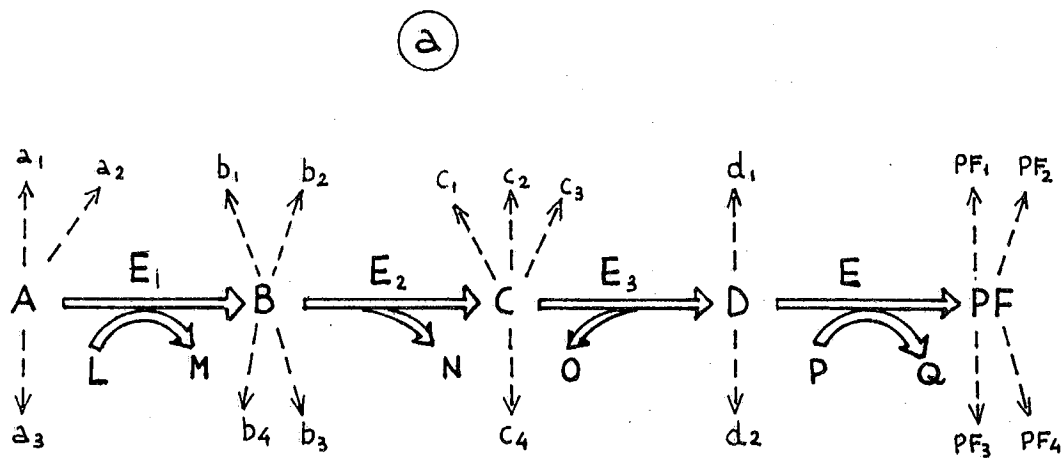


Fig. 5 - 1

Fig. 5-2

Diagramma delle attività enzimatiche massime degli enzimi glicolitici.

La larghezza dei rettangoli è proporzionale all'attività degli enzimi della tabella 5-2a. I numeri degli enzimi sono gli stessi della tabella. R = enzima regolato.

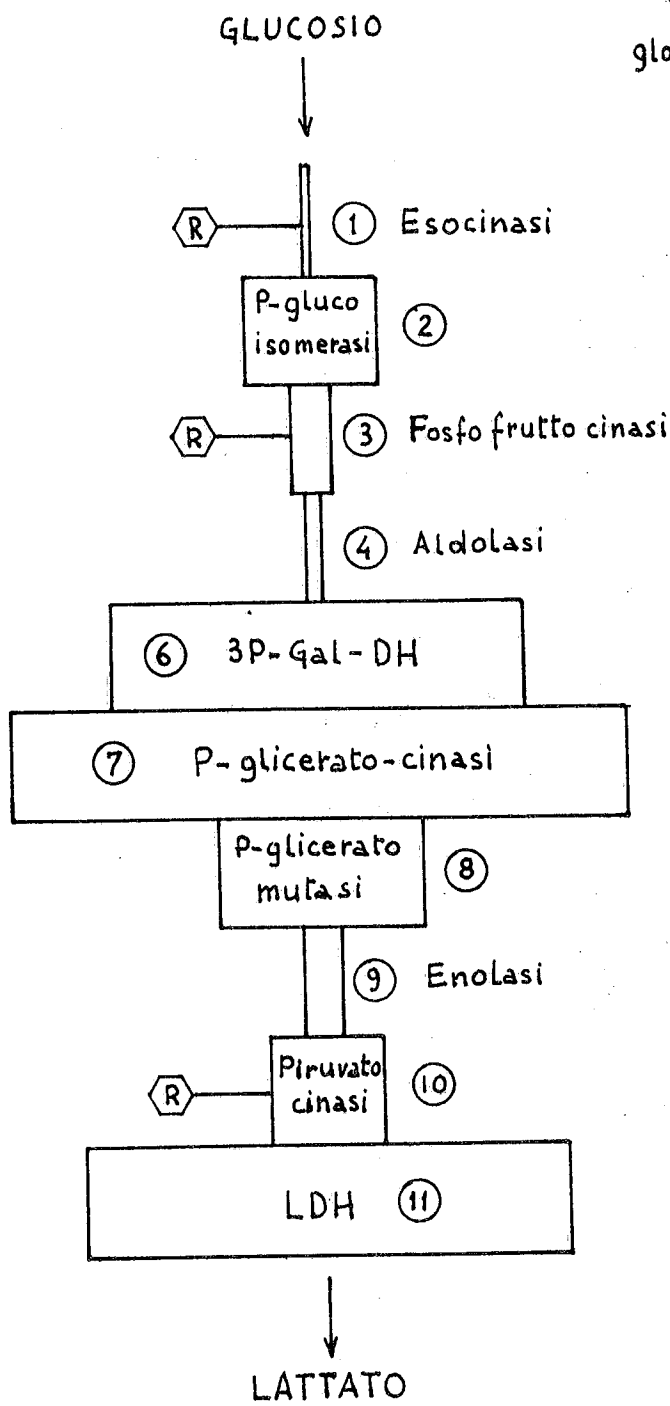
Gli enzimi regolati hanno attività inferiori a quelle degli enzimi non regolati, fanno eccezione l'aldolasi, l'enolasi, piruvato cinasi (per ulteriori spiegazioni vedere il testo).

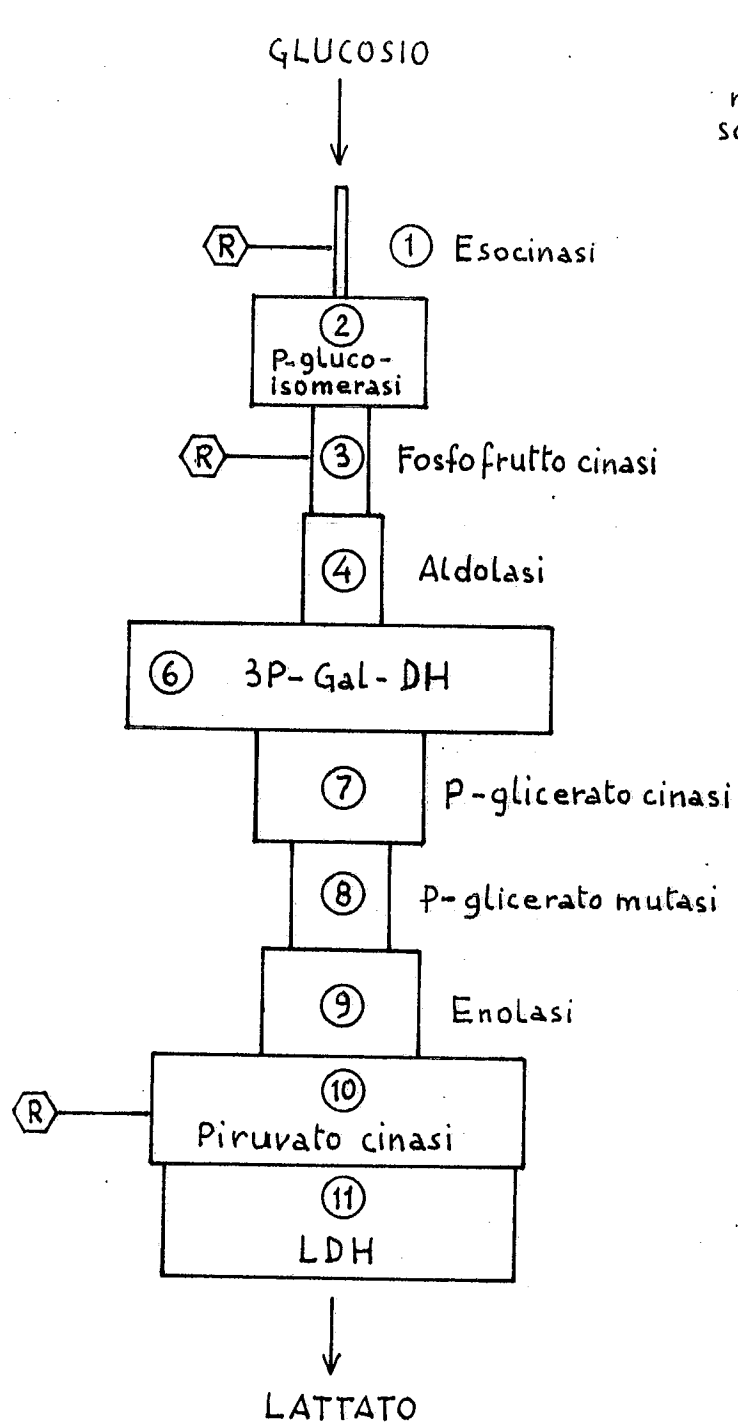
a) Enzimi glicolitici dei globuli rossi.

b) Enzimi glicolitici del muscolo scheletrico.

(a)
globulo rosso

Fig. 5-2





⑤
muscolo
scheletrico

Fig. 5-2

Fig. 5-3

La glicolisi è rappresentata come una serie di serbatoi comunicanti.

Il liquido nei serbatoi rappresenta la concentrazione dei reagenti. Ogni serbatoio è posto, rispetto al precedente di sinistra, ad un livello che è proporzionale al ΔG° della reazione indicata tra i serbatoi. Il dislivello del liquido nei serbatoi è proporzionale al $\Delta G'$ ($\Delta G' = \Delta G$ a pH costante) delle stesse reazioni (i valori dei ΔG° e $\Delta G'$ sono presi dalla tabella 5-1).

I tubi tra i serbatoi rappresentano le reazioni enzimatiche, ed hanno la dimensione del diametro in relazione alla velocità di reazione che rappresentano. Diametro piccolo per le reazioni non all'equilibrio, più grande per le reazioni all'equilibrio. R = enzimi regolati.

Questo modello idraulico ha lo scopo di mostrare:

1) Come sono superati i blocchi energetici costituiti dalle reazioni che, in condizioni standard, hanno spontaneità in senso inverso a quello della via metabolica. Queste reazioni sono rappresentate da serbatoi posti ad un livello più alto del serbatoio a loro precedente. E' sufficiente elevare il livello del liquido del serbatoio più basso fino al punto in cui il pelo dell'acqua è più alto della base del serbatoio; per far fluire il liquido verso valle. Nella cellula le concentrazioni dei reagenti e prodotti non sono quelle delle condizioni standard, esse hanno valori che non superano 10 mM (escluso l' H_2O che è circa 55 M). Nella cellula i reagenti ed i prodotti sono presenti in concentrazioni uguali o molto vicine a quelle di equilibrio della reazione stessa.

2) Come si possa mantenere nella cellula una reazione non all'equilibrio. Come per i serbatoi contigui, è sufficiente che il tubo di comunicazione sia sufficientemente piccolo ed il serbatoio a monte sia continuamente rifornito e quello a valle continuamente smaltito, ambedue con la stessa velocità. La reazione è mantenuta non all'equilibrio se l'attività dell'enzima che la catalizza è relativamente bassa e con uguale velocità è reso disponibile il substrato(i) ed eliminato(i) il prodotto(i) di reazione. In questo modo la concentrazione del substrato(i) risulta più alta e quella del prodotto(i) più bassa di quella osservabile in condizioni di equilibrio.

3) Nelle reazioni non all'equilibrio c'è perdita di energia che viene spesa anche per spingere le reazioni all'equilibrio, dove i reagenti sono trasformati in prodotto senza perdita di energia.

Nei serbatoi contigui in cui c'è dislivello di liquido, c'è perdita di energia che è spesa per muovere il liquido nei serbatoi in cui il liquido è allo stesso livello. Questo viene trasferito da un serbatoio all'altro senza perdita di energia non essendoci caduta di livello di liquido.

4) La regolazione della velocità delle reazioni non all'equilibrio è opportuna perchè limitando queste reazioni, si limitano anche le reazioni all'equilibrio, mentre limitando le reazioni all'equilibrio, si provoca accumulo dei metaboliti prodotti dalle reazioni non all'equilibrio poste a monte di queste stesse reazioni.

L'accumulo incontrollato di metaboliti intermedi è in genere dannoso alla cellula. Molte malattie metaboliche risultano dall'aumento di concentrazione di metaboliti. normali costituenti cellulari.

Bloccando il flusso dei serbatoi che hanno caduta di liquido, si può limitare il flusso di liquido verso il serbatoio più basso senza provocare tracimazione, che avviene se si blocca il flusso dei serbatoi all'equilibrio, perchè si trovano sempre a valle di un serbatoio più alto e/o della sorgente.

5) Quando ci sono più reazioni regolate nella stessa via metabolica, la regolazione di queste reazioni è coordinata, onde evitare accumuli o carenze di metaboliti dannosi alla cellula (vedere fig. 5-5).

Essendoci più punti di chiusura, la chiusura dei serbatoi deve essere coordinata. Chiudendo anche parzialmente la prima saracinesca (R) e non le altre, si può abbassare il livello del liquido al punto di non poter superare i serbatoi posti a livelli più alti, causando il blocco non voluto del flusso di tutto il sistema di serbatoi. La chiusura, anche parziale, della seconda o terza saracinesca e non della prima, può causare la tracimazione di alcuni serbatoi.

L'esempio idraulico ha molti limiti e rispecchia solo alcuni aspetti della via metabolica e quindi deve essere limitato alle considerazioni e scopi sopra indicati.

Fig. 5-4

Meccanismi metabolici che evitano carenze ed eccessi del primo metabolita della via metabolica.

Questi meccanismi hanno la funzione di evitare che nella cellula la concentrazione allo stato stazionario del 1° metabolita (A) abbia grosse oscillazioni e quindi causi variazioni non volute del flusso della via metabolica. L'eccesso di A nel sangue e quindi nella cellula viene rimosso:

1) Polimerizzando A. La polimerizzazione causa piccole modifiche nella molecola di A, per cui quando si verifica la necessità, il polimero può essere con poche reazioni convertito di nuovo in A. La polimerizzazione è la miglior forma di deposito di A.

2) Convertendo A in un metabolita di deposito (MD) che nella cellula non può più essere convertito in A ma è anch'esso utile perchè può essere convertito nel prodotto finale (PF). La carenza di A può essere evitata:

1) Riconvertendo il polimero di A in A.

2) Sintetizzando A da metaboliti (M) che provengono da macromolecole funzionali, non di deposito, le quali sono convertite in M quando c'è carenza di A. Nella figura si considera la possibilità che A possa anche essere esportato dalla cellula nel sangue. Ciò si verifica quando la cellula è deposito di A e/o produce A per tutto l'organismo.

3) Convertendo MD in PF. Questo meccanismo entra in funzione per risparmiare A, perchè sebbene non produca A ne assolve le funzioni producendo PF, che è il metabolita necessario alla cellula e nel quale è convertito A.

A può essere identificato con il glucosio, il suo polimero è il glicogeno, i metaboliti di deposito MD sono i trigliceridi, M sono gli aminoacidi, le macromolecole funzionali sono le proteine (che negli animali non sono depositi di aminoacidi) e PF è l'ATP. La cellula, capace di importare dal sangue gli eccessi di A e di rifornire il sangue di A, è l'epatocita.

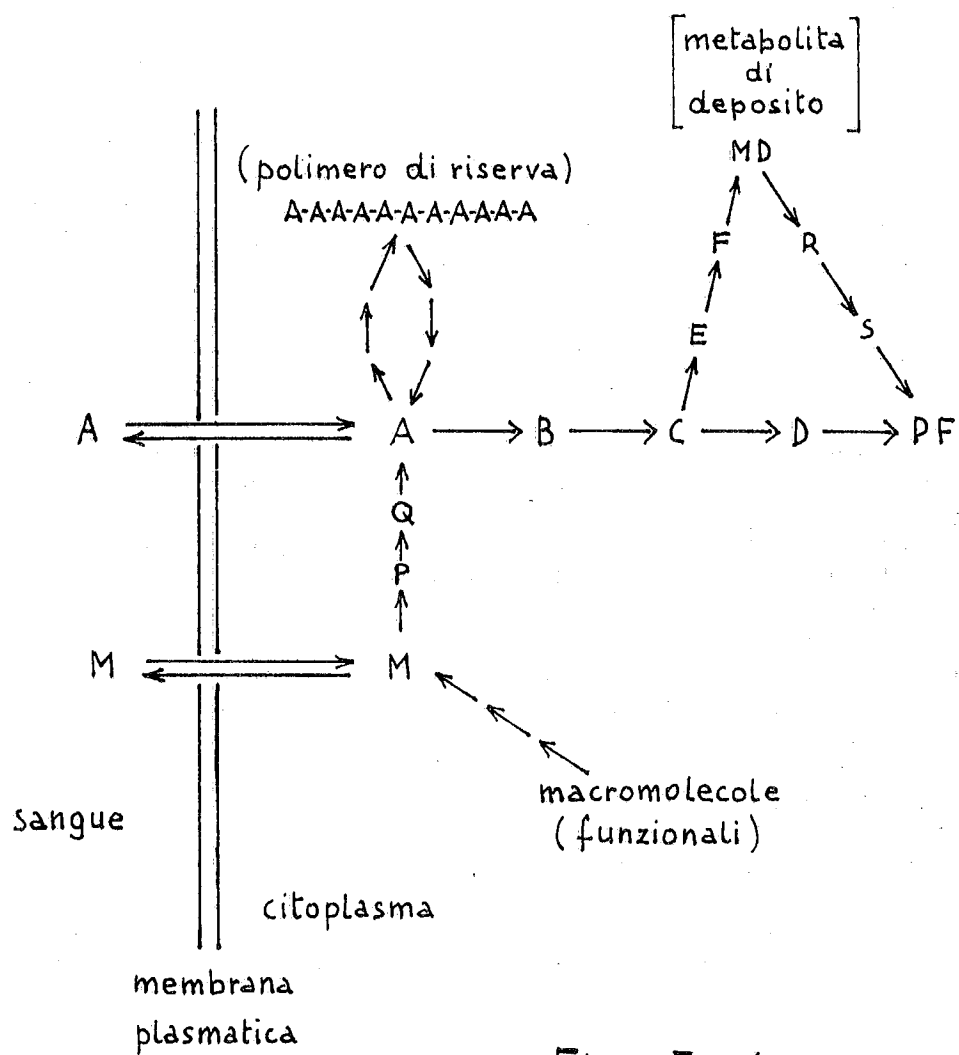


Fig. 5-4

Fig. 5-5

Proprietà di una via metabolica lineare e della sua regolazione da substrato, da effettore e da ormone.

a) Modello della via metabolica e del suo meccanismo di regolazione.

A è il 1° substrato; B, C, D, sono gli intermedi metabolici;

PF = prodotto finale; Er = enzima regolato;

E_1 , E_2 , E_3 = enzimi regolati da substrato. Le frecce da A a PF indicano il flusso metabolico. La freccia dopo PF indica che il metabolita finale è continuamente eliminato (esce dalla cellula o è rapidamente convertito in un altro metabolita). PF può anche provenire dalla dieta. Le frecce prima di A indicano che A è continuamente rifornito per via ematica, ma se non viene utilizzato, ritorna nel sangue, per cui si accumula poco nella cellula. La linea tratteggiata ed il segno meno indicano che l'enzima Er è inibito da PF. Lo stesso enzima può essere attivato da un ormone-1 che attraverso una serie di enzimi (proteina cinasi non indicati in figura) fosforilano l'enzima Er. La fosforilazione porta all'attivazione di Er ed alla sua insensibilità all'effettore PF. L'attivazione ormonale di Er è rimossa dall'azione di un enzima proteina fosfatasi che defosforila Er convertendolo nella forma meno attiva. La proteina fosfatasi è attivata dall'ormone-2. I due ormoni sono antagonisti, vengono secreti in stati metabolici diversi e lo stimolo alla secrezione di un ormone non influenza o inibisce la secrezione dell'altro.

b) L'attività catalitica massima ($\mu\text{moli/g}$ tessuto fresco) è l'attività totale dell'enzima dosato in V_{max} in assenza di effettori. Er, che catalizza la reazione non all'equilibrio (grafico e), ha attività totale per cellula minore rispetto agli altri enzimi che catalizzano le reazioni che sono all'equilibrio.

c) I grafici della V_i in funzione delle concentrazioni dei substrati, sono normalizzati dando valore 100 alle rispettive V_{max} .

Le attività catalitiche dei singoli enzimi dipendono dalle concentrazioni cellulari dei rispettivi substrati. Nello schema si assume che la concentrazione di A sia costante e che la V_i della reazione catalizzata da Er vari per azione dell'effettore PF e per azione dell'ormone.

Su ciascun grafico $V_i/[S]$ delle reazioni catalizzate da enzimi non regolati (reazioni all'equilibrio) sono indicate tre concentrazioni di substrato che corrispondono a quelle che si hanno nella cellula quando l'enzima Er è inibito da PF (1), Er non inibito (2) ed Er attivato da ormone (3).

Le condizioni rappresentate sono tre:

1) Er è tutto nella forma defosforilata ed è fortemente inibito da PF. Questa è la condizione in cui la $C_{\text{ss}}\text{-PF}$ cellulare è al suo massimo fisiologico ed inibisce Er a più del 90%.

2) Er è tutto nella forma defosforilata ed è scarsamente o non è inibito da PF, la $C_{\text{ss}}\text{-PF}$ è al suo minimo fisiologico. In questa condizione pochissime molecole di PF si possono associare ad Er ed inibirlo. Si ha la massima attività di Er defosforilato (punto 2 in c).

3) Er è tutto fosforilato e nella sua forma più attiva

(punto 3 in c). Er fosforilato è anche insensibile a PF. L'insensibilità all'inibizione da PF è molto utile perchè, stimolando al massimo il flusso metabolico, la C_{ss}-PF può elevarsi al fine di favorire una maggiore velocità dell'utilizzazione del PF stesso in altre vie e/o la sua esportazione dalla cellula. In queste condizioni, se Er-fosforilato fosse sensibile all'inibizione da PF, l'attivazione dell'enzima operata dall'ormone sarebbe limitata dall'inibizione da effettore.

Il fatto che la regolazione da effettore richieda una riduzione della C_{ss}-PF per attivare la via metabolica, mentre quella ormonale può ottenere l'attivazione senza ridurre la C_{ss}-PF, differenzia i due tipi di regolazione. Le velocità delle reazioni all'equilibrio sono in relazione alle C_{ss} dei rispettivi substrati, che a loro volta dipendono dall'attività catalitica di Er.

L'ormone-1 ha anche la proprietà di attivare il complesso di proteine di trasporto transmembrana (PTT) specifico per il 1° metabolita della via (A) in modo che l'alta attività di Er-fosforilato non sia limitata da carenza di PF. Non tutti gli ormoni che attivano l'enzima regolato di una via metabolica hanno anche la proprietà di attivare la proteina di trasporto transmembrana del 1° metabolita.

In condizioni metaboliche in cui nel sangue la C_{ss}-ormone-1 è bassa e la C_{ss}-ormone-2 è alta, la proteina fosfatasi è più attiva della proteina cinasi, ed in conseguenza di ciò Er è quasi esclusivamente nella forma defosforilata che è meno attiva di quella fosforilata ed è sensibile al PF. In queste condizioni l'attività di Er oscilla tra i valori 1 e 2 in relazione alla C_{ss}-PF. Per altri dettagli vedere testo.

d) Valori dei G' delle singole reazioni e della via metabolica. Nelle condizioni cellulari la prima reazione non è all'equilibrio e tende a raggiungerlo nel verso della via metabolica che produce PF. Le altre reazioni sono all'equilibrio allo stato stazionario, cioè le C_{ss} dei reagenti e prodotti hanno valori uguali o molto vicini a quelli che avrebbero se le reazioni fossero all'equilibrio termodinamico.

e) Valori dei G° delle singole reazioni. Due reazioni hanno il G° negativo ed uno positivo, per cui, in condizioni standard, la via metabolica non può procedere in un senso o nell'altro.

La via metabolica può essere regolata variando la concentrazione degli enzimi, mediante regolazione dell'espressione dei rispettivi geni. Questa regolazione, che è più lenta di quella da effettore e di quella da ormone che agisce su enzimi e proteine già presenti nella cellula, è detta "adattamento". Essa opera in risposta a particolari condizioni metaboliche prolungate nel tempo e spesso per azione di ormoni liberati nel sangue in quelle condizioni. Un incremento della concentrazione degli enzimi ed in particolare di Er fa aumentare la velocità di sintesi di PF anche se la [A] rimane costante. La riduzione della concentrazione degli enzimi, che avviene per inibizione dell'espressione dei rispettivi geni e concomitante azione delle proteasi cellulari, causa la riduzione della velocità di sintesi di PFs.

f) la via metabolica e la sua regolazione hanno le

caratteristiche descritte nelle figure a-e. Il metabolita prodotto finale (PF) è esportato, dalle cellule che lo sintetizzano, nel sangue e da qui importato da altre cellule dello stesso organismo che utilizzano PF ma non hanno la via metabolica per sintetizzarlo. Il sistema di regolazione da effettore (PF) descritto in fig. a e nel testo è sufficiente a regolare la produzione di PF anche per le necessità di cellule di altri tessuti ed organi quando la richiesta di PF è limitata a piccole quantità. Le cellule che utilizzano PF prelevandolo dal sangue fanno diminuire, la C_{ss} di PF_e (ematica); ciò causa un incremento del flusso di PF dalle cellule che lo sintetizzano verso il sangue. La C_{ss} di PF in queste cellule diminuisce e quindi automaticamente viene aumentata l'attività della via metabolica che sintetizza PF (vedere fig. 5-5 a). Quando le cellule riducono l'utilizzazione e quindi il prelievo di PF dal sangue, la C_{ss}-PF_e torna a salire e quindi il flusso di PF dalle cellule che lo sintetizzano si riduce, la C_{ss}-PF (intracellulare) aumenta ed automaticamente rallenta anche la sintesi di PF.

Quando le cellule utilizzano in tempi brevi grosse quantità di PF, il sistema di regolazione da effettore diviene inefficiente perchè basato sulla riduzione nel sangue della C_{ss}-PF. Ciò infatti va contro una rapida e massiccia diffusione di PF dal sangue alle cellule. La caduta di C_{ss}-PF_e oltre i valori compensabili con la regolazione da effettore, fa cambiare il meccanismo di regolazione della via metabolica perchè provoca il rilascio automatico nel sangue di ormone O_A da parte delle cellule endocrine che lo sintetizzano. O_A agisce sulle cellule che sintetizzano PF (sue cellule bersaglio) perchè sulla loro membrana plasmatica sono presenti molecole proteiche, recettori (R_A) che riconoscono specificamente O_A. L'ormone provoca una serie di reazioni (vedere fig. 7-9) che termina con la fosforilazione di E_r (enzima bersaglio). La fosforilazione attiva E_r rendendolo anche insensibile all'azione di PF. Viene prodotta nell'unità di tempo una maggiore quantità di PF, di conseguenza la C_{ss}-PF cellulare ed ematica aumentano, ed in questo modo viene favorita l'entrata di PF nelle cellule che lo utilizzano. La velocità di utilizzazione di PF da parte di queste cellule condiziona il sistema di regolazione ormonale. Se le cellule utilizzano PF ad una velocità tale da mantenere la C_{ss}-PF a livelli inferiori alla normalità, l'ormone continua ad essere rilasciato e quindi a stimolare il meccanismo sopra descritto. Se le cellule dopo aver abbassato la C_{ss}-PF_e ematica e quindi provocato il rilascio dell'ormone, diminuiscono gradualmente l'utilizzazione di PF in modo che la C_{ss}-PF rimanga entro livelli normali, la C_{ss}-O_A decresce nel sangue e la velocità di sintesi di PF cessa di essere controllata dall'ormone O_A, per essere controllata da effettore, cioè dalle C_{ss}-PF_e (cellulare). Questo perchè, la proteina cinasi non è più attivata da O_A e la proteina fosfatasi, che è sempre un po' attiva anche se non attivata da O_A, defosforila E_r rendendolo meno attivo e sensibile all'inibizione di PF.. Gli ormoni sono messaggeri chimici intercellulari con un tempo di vita ben definito ed in genere breve, così appena rilasciati dal sangue iniziano ad essere degradati o

modificati dalle cellule dell'organismo (fegato, polmone ecc.) e perdono la loro attività biologica. Affinchè l'azione ormonale possa continuare nel tempo, occorre che nuove molecole di ormone siano continuamente rilasciate nel sangue. Occorre cioè che permanga nel tempo lo stimolo al rilascio dell'ormone nel sangue e che la Css -ormone ematica permanga al di sopra di certi livelli. Nell'esempio in figura lo stimolo al rilascio di O_A è una Css - PF_e più bassa di quella compensabile per variazione di Css - PF_c (cellulare). Questa concentrazione rimane bassa fino a quando PF è utilizzato in quantità notevoli dalle cellule dell'organismo. Maggiore è il tempo in cui la Css - PF è inferiore ai valori medi normali, e maggiori sono nel tempo le quantità di O_A che sono rilasciate dal sangue. Se questo stato dura per tempi lunghi (alcune ore) e/o è ripetuto tutti i giorni, l'azione ormonale agisce sulla regolazione dell'espressione genica degli enzimi della via metabolica che sintetizza PF determinando un incremento della loro concentrazione cellulare. Nell'esempio in figura, l'ormone O_A ha anche la capacità di attivare il complesso di proteine (PTT) responsabile del trasporto del 1° metabolita (A) all'interno della cellula, al fine di evitare che l'azione di attivazione che l'ormone esercita su E_r sia limitata da carenze di A, cioè da riduzione della Css -A cellulare provocata dall'attivazione di E_r stesso. Se la Css - PF_e aumenta per riduzione dell'utilizzazione di PF e/o per una sua immissione nel sangue con l'alimentazione, automaticamente l'ormone O_A non viene più rilasciato nel sangue e la sua Css - O_A ematica decresce nel tempo. Se la Css - PF_e aumenta oltre certi limiti, automaticamente viene rilasciato l'ormone O_I da parte di cellule endocrine (diverse da quelle secernenti O_A).

O_I è antagonista di O_A , cioè stimola l'enzima proteina fosfatasi e quindi la defosforilazione di E_r , rendendolo meno attivo e sensibile all'inibizione di PF . In queste condizioni, la Css - PF_c è alta ed E_r è inibito da effettore provocando un'ulteriore riduzione nella sintesi di PF . Il duplice meccanismo di regolazione (da effettore ed ormonale) permette di far variare la velocità di sintesi di PF in relazione alle esigenze di PF delle cellule che lo producono e di altre cellule dell'organismo che sono incapaci di sintetizzarle.

E' importante notare che la regolazione da ormone e da effettore hanno come bersaglio lo stesso enzima (E_r), e ciò non appare casuale perchè solo regolando l'enzima si può regolare tutta la via metabolica (vedere testo).

Un ormone può avere la proprietà di influenzare l'attività di una via metabolica per mezzo dei tre meccanismi di regolazione:

- 1- da substrato, facendo variare la Css -1° metabolita agendo sulle proteine di trasporto transmembrana.
- 2- facendo variare (mediante fosforilazione) l'attività delle molecole di enzima regolatore della via metabolica, già presenti nella cellula al momento dell'intervento dell'ormone
- 3- facendo variare la concentrazione degli enzimi della via metabolica ed in particolare dell'enzima regolato, regolando l'espressione dei relativi geni.

Non tutti gli ormoni hanno la proprietà di agire contemporaneamente con i tre meccanismi molecolari sopra indicati.

g) La regolazione da effettore e da ormone della via metabolica (schematizzata in fig. f), è rappresentata come un sistema di serbatoi, dove il flusso del liquido è regolato da due galleggianti che agiscono su una stessa saracinesca-rubinetto (E_r). I vari serbatoi (A, B, C, D, E e PF_2) sono posti a livelli diversi, che corrispondono ai ΔG° delle reazioni della via metabolica schematizzata in g. Il livello del liquido nei serbatoi corrisponde al ΔG delle su dette reazioni nelle condizioni cellulari (vedere anche fig. 5-3). Il livello del liquido nei serbatoi è tale che il liquido fluisce da sinistra verso destra e supera il blocco causato dal dislivello positivo tra due coppie di serbatoi (B-C e D-E). Ciò corrisponde a valori di ΔG e cioè a concentrazioni cellulari relative rispettivamente di B e C, tali da superare il valore positivo di ΔG° della reazione. Il livello del liquido nel serbatoio A è costantemente più alto di quello presente nei rimanenti serbatoi. Tale dislivello è determinato dal fatto che il serbatoio A è costantemente rifornito di liquido, il liquido scorre nel primo serbatoio a valle (B) attraverso un tubo che ha diametro inferiore a quello dei tubi che collegano gli altri serbatoi, e perchè la saracinesca (E_r) è sempre un po' abbassata e limita ulteriormente il flusso del liquido. Eventuali eccedenze di liquido nel serbatoio A sono eliminate attraverso il tubo di troppo pieno (tp) in modo che il livello del liquido nel serbatoio A rimanga molto stabile. I serbatoi a valle del serbatoio A hanno tutti lo stesso livello, ed eventuali variazioni sono rapidamente equilibrate perchè i tubi che li mettono in comunicazione sono più grandi di quello tra i serbatoi A e B. Quindi, se un certo volume di liquido passa da A a B, immediatamente lo stesso volume di liquido passa da B a C, e così avanti fino a PF_c .

Analogamente la reazione $A \rightarrow B$ non è all'equilibrio e tende a raggiungerlo nel senso della freccia (ΔG° di reazione < 0 nelle condizioni cellulari), le altre reazioni sono all'equilibrio allo stato stazionario. Ciò è realizzato con l'avere l'enzima E_r con una attività catalitica totale per cellula inferiore a quella degli altri enzimi (E_1 , E_2 , E_3 ed E_4), e con il mantenere E_r un poco inibito da PF , con un flusso di A verso e dalla cellula rapido e continuo, in modo che la $C_{ss}-A$ sia mantenuta costante ed entro precisi valori. Quando anche una piccola quantità di A è convertita in B, rapidamente si ha la conversione in C, D, F fino a PF .

Il serbatoio PF_c ha un rubinetto (r_c) che permette l'utilizzazione del liquido all'interno del locale dove si trova il sistema dei serbatoi. Corrisponde all'utilizzazione del PF da parte delle cellule stesse che lo sintetizzano. Il rubinetto r_c può essere più o meno aperto o completamente chiuso, ed in relazione a ciò il flusso del liquido da A a PF viene regolato opportunamente. La maggiore o minore apertura del rubinetto r_c fa variare il livello di liquido nel serbatoio PF_c e quindi fa spostare verticalmente il galleggiante g (verso l'alto se il rubinetto viene girato

verso la chiusura, e verso il basso se il rubinetto viene girato verso l'apertura). L'asta del galleggiante sposta la barra (br) che ruotando intorno al pernio (p), con la barra bs sposta la saracinesca (Er) rispettivamente verso il basso e verso l'alto. Quindi una minore utilizzazione del liquido (rubinetto rc verso la chiusura) fa innalzare il livello del liquido nel serbatoio PF_c , ed il sistema costituito da g-br-bs porta ad abbassare la saracinesca Er, e quindi a ridurre il flusso. Se rc viene aperto si ha l'effetto opposto. Il liquido può fluire da PF_c nel più grande serbatoio PF_e , e da qui essere prelevato mediante più rubinetti (re).

Se il prelievo od immissione di liquido nel serbatoio PF_e è piccolo, il sistema di regolazione della saracinesca operato dal galleggiante g nel serbatoio PF_c è sufficiente a soddisfare le esigenze, perchè i due serbatoi (PF_c e PF_e) sono in comunicazione tra loro e le variazioni di livello di liquido nel serbatoio PF_e influenzano anche il livello del serbatoio PF_c .

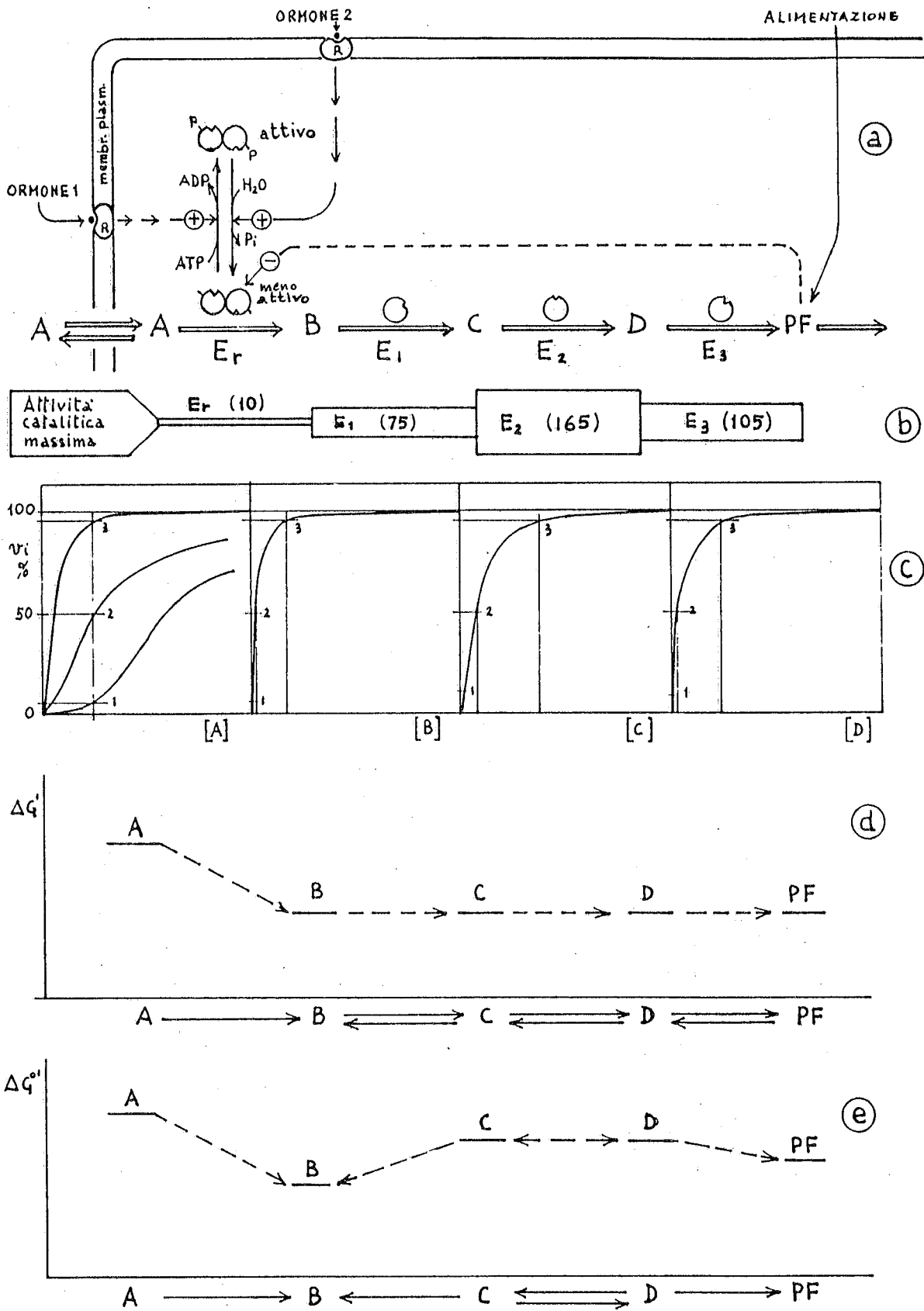
Quando il prelievo dal serbatoio PF_e è tale da provocare una variazione notevole del livello del liquido, il galleggiante (gg), l'asta ed il braccio (O_A) ad essa collegato, sposteranno l'asta br che farà variare la saracinesca Er indipendentemente dal livello del liquido nel serbatoio PF_c , e quindi del relativo galleggiante. Infatti essendo il galleggiante (gg) di maggior volume ed agendo all'estremo della barra br (leva più lunga), può far variare la posizione della saracinesca (Er) anche in opposizione al galleggiante g (nel caso che il livello di PF_c fosse alto). Il meccanismo funziona anche nel senso contrario, se il livello di liquido aumenta nel serbatoio PF_e e la saracinesca (Er) torna automaticamente ad abbassarsi; tuttavia se l'aumento della $Css-PF_e$ è considerevole, il galleggiante gg si solleva in modo che il braccio O_I sollevi la barra br e causi la chiusura della saracinesca (Er). Tutto ciò corrisponde alla regolazione da effettore operata da un prodotto finale (PF) che inibisce il 1° enzima in relazione alla maggiore o minore utilizzazione e/o esportazione di PF. Per piccole variazioni di utilizzazione/esportazione di PF il sistema è sufficiente a far variare la velocità di sintesi di PF, se la richiesta di PF è tale da far variare la concentrazione ematica di PF interviene il sistema ormonale, che indipendentemente dalla $Css-PF_c$ regola l'attività di Er. Il sistema funziona anche in senso contrario, nel caso che la $Css-PF_c$ aumenti per immissione di PF nel sangue in seguito ad alimentazione o per riduzione dell'utilizzazione di PF da parte delle cellule. Il sistema ormonale prevale su quello da effettore anche se in opposizione, perchè quando attiva Er lo rende anche non sensibile all'effettore.

Nel sistema di serbatoi come nella via metabolica, l'azione dei due sistemi di regolazione è sullo stesso congegno di regolazione, rispettivamente saracinesca (Er) ed enzima Er, perchè solo regolando tale congegno si può regolare rispettivamente il sistema di serbatoi e la via metabolica. In figura è indicata anche la proprietà accessoria che alcuni ormoni hanno di regolare il flusso dal sangue all'interno delle cellule del 1° metabolita della via

metabolica. Il galleggiante gg tramite il braccio O_A agisce su un'altra barra (bf), che ruotando intorno al pernio (p) fa aprire la saracinesca-rubinetto (PTT) simultaneamente a quella Er che è la regolatrice del flusso del liquido nel sistema dei serbatoi. La possibilità di agire sulla saracinesca PTT evita che il flusso dal serbatoio A e quello B sia limitato da una caduta di livello nel serbatoio A. L'eccesso di liquido nel serbatoio A è eliminato dal tubo tp.

Quando il livello del liquido aumenta nel serbatoio PF_e , il galleggiante gg si solleva ed il braccio O_A non agisce più sulle due barre, così le due saracinesche PTT ed Er tornano ad abbassarsi automaticamente. Se il liquido nel serbatoio PF_e aumenta molto, il galleggiante gg si solleva ed il braccio O_I agendo sull'asta br fa muovere più rapidamente verso chiusura la saracinesca Er ed il flusso del liquido viene ridotto più rapidamente. Tuttavia, O_I non agisce sulla saracinesca PTT. Ciò corrisponde ad una situazione in cui il complesso di proteine trasportatrici PTT è sensibile all'azione dell'ormone O_A (che attiva il trasporto di A), ma non all'ormone O_I . Con la riduzione della $Css-O_A$ ematica, anche l'attivazione dell'ormone O_A sul complesso PTT decade nel tempo automaticamente come tutti meccanismi regolati quando manca l'azione (stimolo) che li ha provocati.

Fig. 5-5



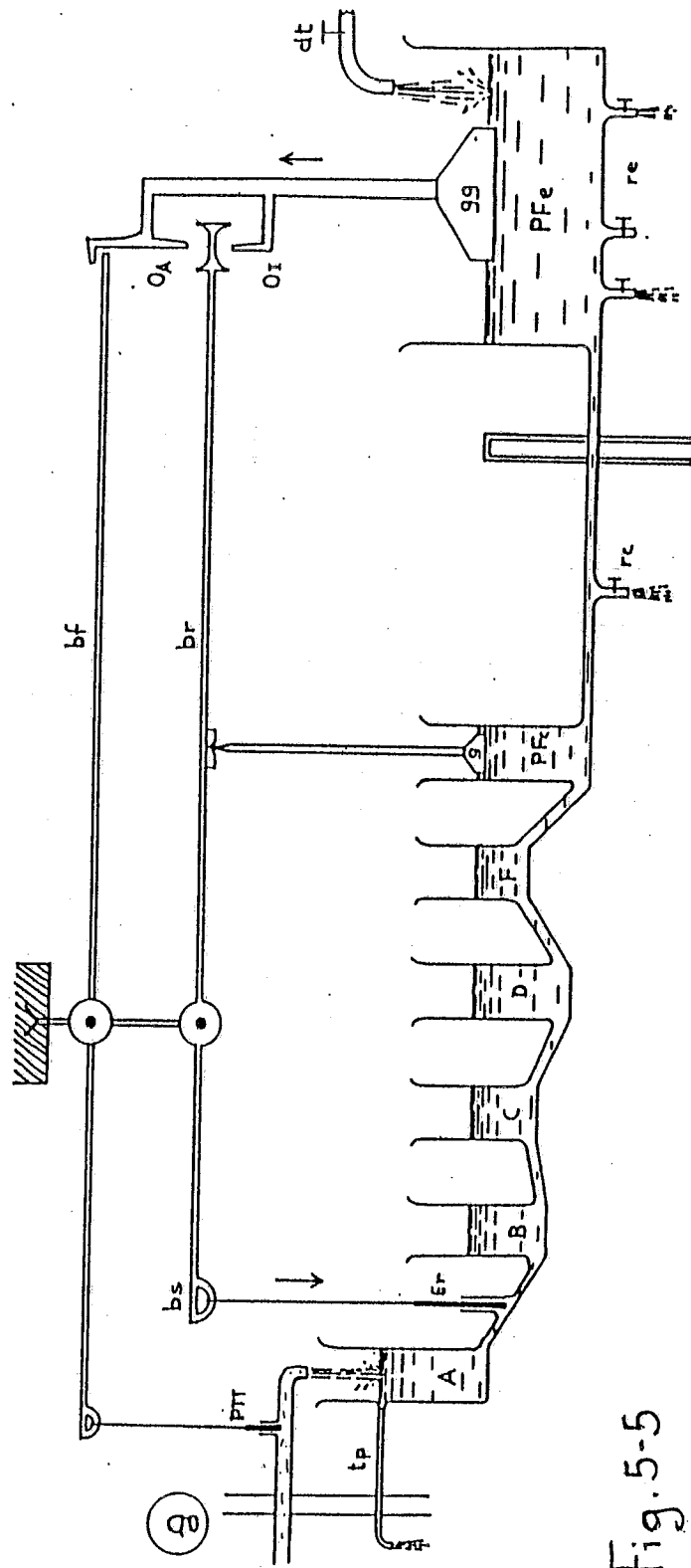
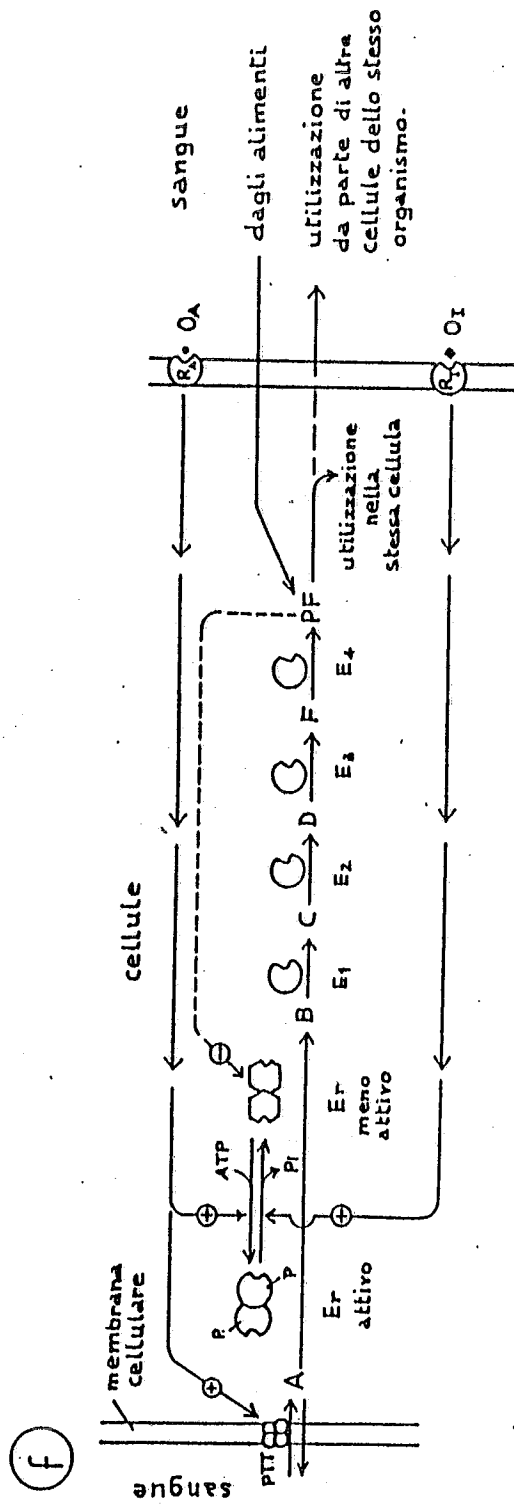


Fig. 5-5

Fig. 5-6

Meccanismi di regolazione di vie metaboliche.

Gli enzimi regolati sono disegnati con un doppio cerchio (di cui uno parzialmente coperto) per indicare la loro natura oligomerica. Gli enzimi non regolati non sono indicati.

E_1 , E_2 , E_3 = Enzimi regolati; PC = pace-maker, enzima che regola tutta la via. Le frecce continue indicano le reazioni, le frecce tratteggiate la regolazione da effettore (- negativo, + positivo) e la rimozione di attivazione o di inibizione (x); PF = prodotto finale della via metabolica. Le percentuali indicano i valori massimi di inibizione operata sull'enzima dall'effettore indicato. Questi valori non raggiungono mai il 100% di inibizione perchè l'inibizione da effettore è una reazione di associazione reversibile nelle condizioni cellulari, per cui si ammette che una certa quantità di enzima libero da effettore esista sempre anche quando la concentrazione allo stato stazionario (Css) dell'effettore è al suo massimo fisiologico. Da ciò risulta che le vie metaboliche inibite al massimo hanno un valore piccolo (ma non nullo) di flusso. Poichè ogni via metabolica ne ha una parallela che funziona in senso opposto (cioè sintetizza il 1° substrato da PF), l'incompleta inibizione delle vie metaboliche causa il turnover metabolico.

I metaboliti effettori sono indicati in parentesi quadra.

a) Via ramificata che porta alla sintesi di due PF. La regolazione da effettore di questa via è costruita per avere uguali concentrazioni dei due prodotti finali.

Supponiamo che C_{ss} di PF_1 e PF_2 siano ambedue basse, gli enzimi (PM, E_1 , E_2) non sono inibiti e l'intermedio C è utilizzato per la sintesi di PF_1 e per quella di PF_2 in quantità inverse alle concentrazioni dei rispettivi PF.

Se la C_{ss} - PF_1 è maggiore della C_{ss} - PF_2 , una maggiore quantità di C prenderà la via di sintesi del PF_2 perchè E_2 sarà meno inibito di E_1 , e ciò continuerà fino a quando le C_{ss} dei due PF non saranno uguali.

Quando PF_1 è presente nella cellula in alta concentrazione, mentre PF_2 è presente in bassa concentrazione, PF_1 inibisce al 49% PM ed al 98% E_1 . PF_2 inibisce scarsamente o non inibisce sia PM che E_2 . Dalla combinazione di queste inibizioni risulta che PM funziona al 51% e l'intermedio C prodotto prende quasi esclusivamente la via della sintesi di PF_2 poichè E_1 è inibito al 98% mentre E_2 è scarsamente o non è inibito. La C_{ss} di PF_2 aumenterà rapidamente e comincerà ad inibire E_2 e PM fino ad arrivare rispettivamente al 98% e 49% di inibizione. A questo punto PF_2 avrà la stessa C_{ss} di PF_1 e la via metabolica sarà inibita al 98%.

Per avere le stesse concentrazioni di PF_1 e di PF_2 occorre che le attività residue degli enzimi inibiti E_1 e E_2 risultino uguali e quindi le affinità di PF e PF per i rispettivi siti di regolazione devono essere anch'esse uguali.

b) Via metabolica ramificata che porta alla sintesi di due PF. La regolazione della via è costruita in modo che la sintesi di PF_1 abbia la precedenza nel tempo rispetto a quella di PF_2 e che la sintesi di PF_2 avvenga solo quando la C_{ss} - PF_1 è ottimale.

Supponiamo che le C_{ss} di PF₁ e PF₂ siano ambedue basse, e quindi E₁, E₂ e PM siano attivi. L'intermedio C prodotto prenderà preferenzialmente la via di sintesi di PF₁ perchè PM è attivo, mentre E₂ è poco o non attivo. E₂ in presenza di basse C_{ss} dell'intermedio C è inattivo o poco attivo, e nelle condizioni sopra indicate (C utilizzato per la sintesi di PF₁) la C_{ss}-C è insufficiente a stimolare E₂. La C_{ss}-PF₁ si eleverà rapidamente perchè tutto il flusso metabolico è convogliato verso PF₁. Con il crescere della C_{ss}-PF₁ verrà progressivamente inibito PM che causerà un incremento della C_{ss}-C. Si avrà così l'attivazione di E₂ e quindi l'utilizzazione di C per la sintesi di PF₂ che continuerà fino a quando la C_{ss}-PF₂ non sarà sufficientemente alta da inibire E₂ e rimuovere l'effetto di attivazione di C. La simultanea inibizione di PM e E₂ causa un incremento della C_{ss}-C che determina anche l'inibizione di E₁ e quindi di tutta la via. Se la C_{ss}-PF₁ diminuisce, il flusso metabolico viene nuovamente canalizzato verso la sintesi di PF₁. Se la C_{ss}-PF₂ diminuisce, viene attivata la sintesi di PF₂ solo se PF₁ è presente in concentrazioni ottimali o comunque sufficientemente alte da inibire (anche parzialmente) il PM. L'inibizione di PM deve provocare un incremento della C_{ss}-C capace di attivare E₂, e quindi convogliare l'intermedio C verso la sintesi di PF₂.

Tutto ciò indica che PF₁ è il prodotto finale principale (sintetizzato preferenzialmente) della via metabolica. PF₂ è sintetizzato solo quando PF₁ è in C_{ss} ottimale e C è in eccedenza. PF₂ è quindi un prodotto secondario della via metabolica. PF₂ ha le caratteristiche di un prodotto di deposito che raccoglie l'eccesso di A.

Questa via ramificata è un esempio di via regolata in cui il PM non catalizza la prima reazione della via metabolica.

c) Via metabolica ramificata convergente su un unico prodotto finale. L'eccesso di PF inibisce PM e ciò causa un incremento della C_{ss}-B, da ciò si ha la simultanea inibizione di E₁ e di E₂ e quindi di tutta la via metabolica. I due primi substrati possono essere usati indistintamente contemporaneamente, o l'uno o l'altro separatamente. Questa doppia possibilità rende più improbabile il rallentamento della sintesi di PF per carenza di substrato.

d) Via metabolica ramificata convergente su unico prodotto finale. Il meccanismo di regolazione è costruito in modo che A sia usato in preferenza. L'eccesso di A₁ inibisce E₂; A₂ non è utilizzato o è utilizzato in minore quantità in relazione alla C_{ss}-A₁. A₂ è un substrato di scorta che interviene quando la quantità utilizzabile di A₁ è insufficiente.

L'eccesso di PF inibisce PM, ciò causa un incremento della C_{ss}-B che inibisce E₁ e E₂ e quindi viene inibita tutta la via metabolica.

X è un prodotto del catabolismo di PF, per cui la C_{ss}-X aumenta quando la C_{ss}-PF diminuisce; inoltre, poichè X è anche substrato della reazione di sintesi PF, quando la C_{ss}-PF aumenta la C_{ss}-X diminuisce. Quando il PF è utilizzato la sua C_{ss} diminuisce, ed in questo modo il PM risulta più attivo per riduzione della sua inibizione operata da PF, così avanti fino a quando il PM è

completamente disinibito. A questo punto ulteriori riduzioni delle C_{ss}-PF non possono far aumentare l'attività del PM. Tuttavia la forte utilizzazione di PF che causa la riduzione della C_{ss}-PF, causa in parallelo l'incremento della C_{ss}-X. In questo modo, l'attività del PM è incrementata, oltre che per disinibizione, per azione dell'effetto di attivazione di X. Questa azione favorisce l'incremento della velocità di sintesi di PF anche quando la C_{ss}-PF è molto bassa perchè PF è utilizzato velocemente.

Poichè l'effetto di X entra in gioco prima che la C_{ss}-PF sia a livelli molto bassi, la funzione di attivazione di X (feed back positivo) può essere quella di incrementare la sintesi di PF prima che la C_{ss}-PF si sposti a livelli troppo bassi (vedere fig. 7-21, regolazione da ATP ed AMP dell'enzima fosfofruttocinasi).

e) Via metabolica costituente un ciclo di metaboliti intermedi. In condizioni in cui la C_{ss}-PF₁ sia scarsa, PM è attivo ed M è convertito in Q ed entra nel ciclo. Il ciclo produce e libera l'intermedio G e da questo è prodotto PF₁. P è convertito prevalentemente in Q piuttosto che in A, perchè E₁ è poco attivo quando la C_{ss}-Q è bassa. Con l'aumentare della C_{ss}-PF₁, viene progressivamente inibito PM; ciò fa aumentare la C_{ss}-Q che attiva E₁ e porta ad un incremento della C_{ss}-A e quindi della C_{ss} di tutti gli intermedi. L'incremento delle C_{ss} degli intermedi rende il ciclo potenzialmente più capace. Essendoci più molecole di A a disposizione, si possono associare più molecole di Q e quindi effettuare più cicli nell'unità di tempo.

L'inibizione di PM limita il ciclo in relazione alla C_{ss}-PF₁. Se la C_{ss}-PF₁ rimane ottimale, PM è inibito e la reazione anaplerotica $P \longrightarrow A$ è attiva. L'eccesso di intermedi del ciclo viene allontanato convertendo A in T, e T è convertito in PF₂.

Il ciclo è anche la via di sintesi di PF₂ da M. Appena la C_{ss}-PF₁ diminuisce, PM diviene più attivo, la C_{ss}-Q diminuisce, l'attivazione di E₁ decresce e la conversione di P in Q torna ad aumentare.

Il fatto che la C_{ss} degli intermedi possa aumentare solo quando PM è parzialmente inibito da PF₁, sembra un controsenso. Tuttavia, non lo è, se consideriamo che gli enzimi regolati sono costantemente in presenza del loro inibitore fisiologico, perchè esso deve avere una C_{ss} sufficientemente alta, al fine di poter essere utilizzato con alta velocità (un esempio è l'ATP, vedere Cap.7). Quindi, se assumiamo che PM sia un po' inibito anche quando la C_{ss}-PF₁ è al suo minimo fisiologico, ciò è sufficiente a determinare una C_{ss}-Q capace di mantenere attiva E₁ e quindi di garantire costantemente una C_{ss}-A (e quindi anche le C_{ss} degli intermedi) sufficientemente alta da permettere una velocità del ciclo capace di produrre tutto il PF₁ richiesto.

Un eventuale eccesso di A viene rimosso dalla reazione $T \longrightarrow A$. La reazione $T \longrightarrow A$ non è regolata da effettore ma da substrato, cioè dalla C_{ss}-A. Quando la C_{ss}-A aumenta oltre certi valori, la reazione $T \longrightarrow A$ viene attivata e rimuove l'eccesso di A. La reazione $T \longrightarrow A$ dipende dall'attività della reazione catalizzata da E₁. La presenza della reazione $T \longrightarrow A$ implica che E₁ sia sempre un po'

Contemplando condizioni estreme di utilizzo di PF_1 in cui la $Css-PF_1$ sia molto bassa, da non determinare nessuna inibizione di PM ed in conseguenza nessuna attivazione di E_1 , la $Css-A$ rimarrà stabile nel tempo perchè A è continuamente e rapidamente convertito in B mentre la velocità della reazione $A \rightarrow T$ è bassa. Infatti, la parziale inibizione di PM da parte di $Css-PF_1$, ha almeno due funzioni: a) avere la disponibilità di attivare PF e PM per disinibizione, quando la $Css-PF$ diminuisce perchè rapidamente utilizzato (regolazione a feed back negativo); b) mantenere la $Css-Q$ sufficientemente alta da attivare E_1 ed avere la $Css-A$ sufficientemente alta da poter far girare velocemente il ciclo quando PM viene disinibito. Quindi la $Css-PF_1$ inibisce A e PM.

The diagram illustrates a process flow with feedback loops. At the top, node A has a downward arrow to node B. From node B, an arrow points down to node C. From node C, two arrows branch out: one to the left pointing to node D, and one to the right pointing to node E. Node D leads to a box labeled $[PF_1]$, and node E leads to a box labeled $[PF_2]$. A dashed line encloses the feedback loops. From $[PF_1]$, a dashed arrow points up and left to a circle with a minus sign, labeled 49%, which then points to node A. From $[PF_2]$, a dashed arrow points up and right to another circle with a minus sign, labeled 49%, which also points to node A. From node C, a dashed arrow points up and left to a circle with a minus sign, labeled 98%, which points to node B. From node C, another dashed arrow points up and right to another circle with a minus sign, labeled 98%, which points to node B. To the right of the diagram is a circle containing the letter 'a'.

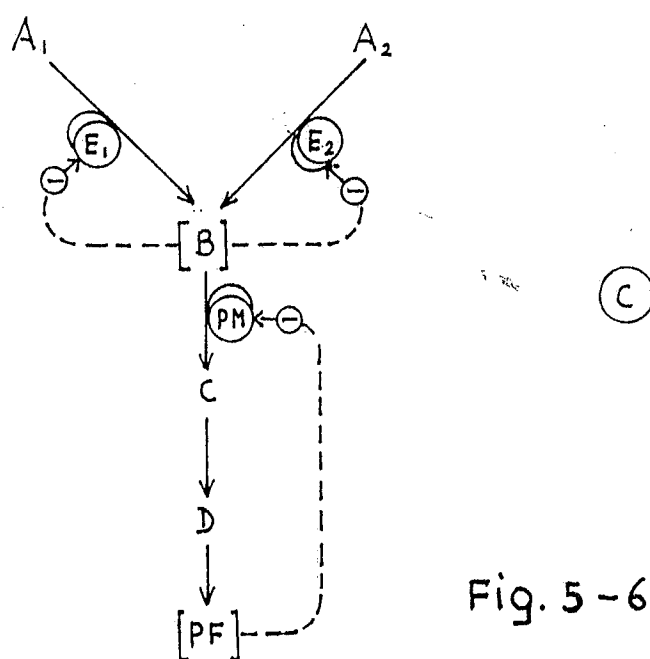
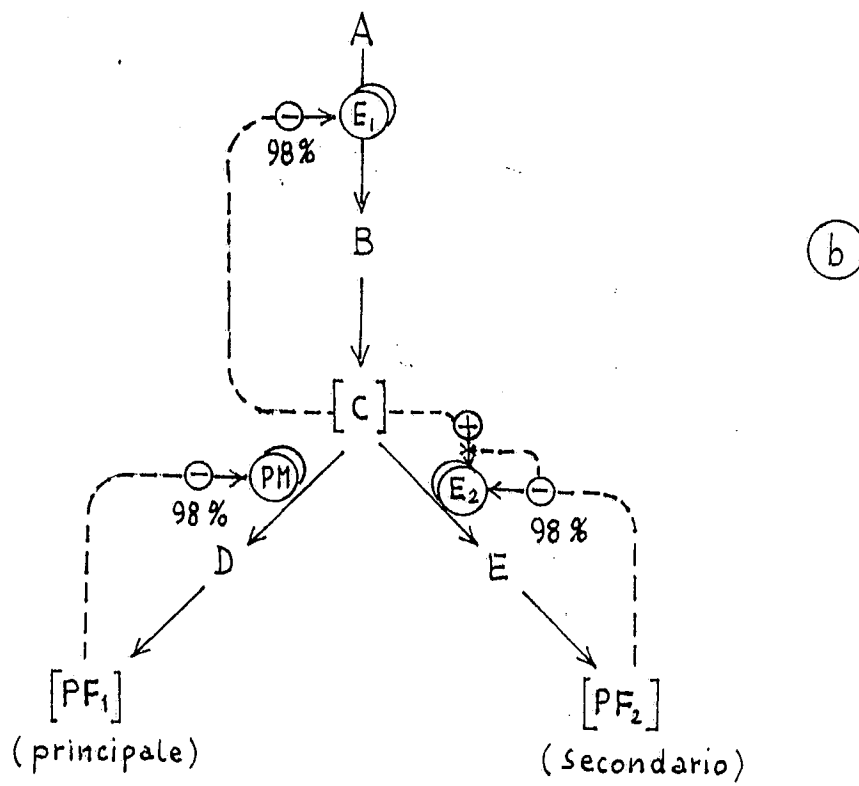
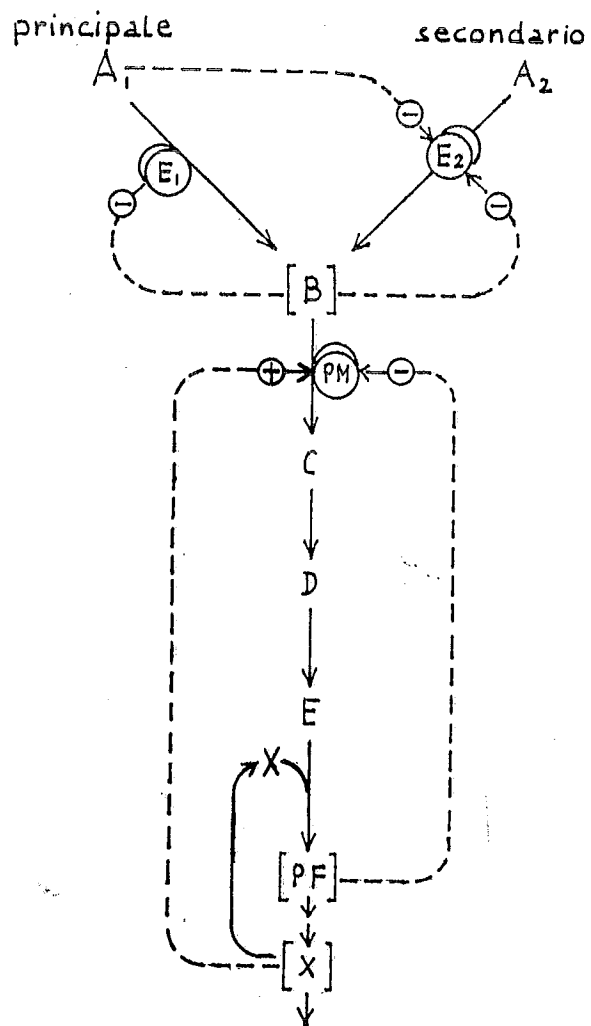
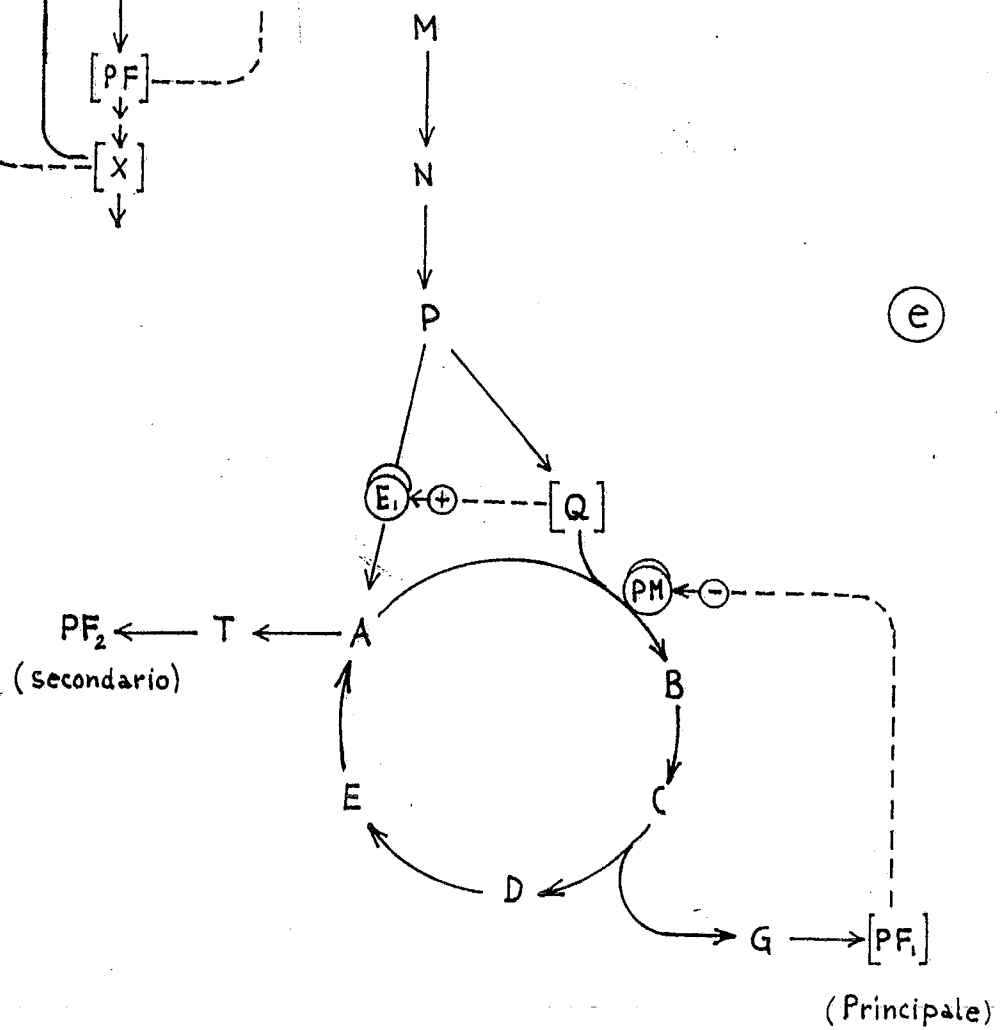


Fig. 5-6



(d)



(e)

Fig. 5-6

Fig. 5-7

Regolazione dei cicli di substrati e loro ruolo nella regolazione delle vie metaboliche.

I numeri vicino alle reazioni indicano la velocità di reazione in $\mu\text{moli/min/g}$ di tessuto fresco. Le frecce vicino a PF indicano, se verso l'alto incremento, se verso il basso decremento della C_{ss}-PF.

La regolazione della sintesi del ciclo futile e di PF, sono controllate dalle concentrazioni di PF che inibiscono PM ed attivano E₁. PF, essendo effettore di ambedue gli enzimi, coordina le rispettive attività.

a) In figura è indicata la condizione in cui PF è sintetizzato con velocità basale (minima) per cui PM è parzialmente inibito ed E₁ poco attivo. Il valore degli effetti di PF sui due enzimi sono diversi, la stessa concentrazione di PF ha sull'attività di PM un effetto inibitorio che è percentualmente maggiore di quello di attivazione operato sull'attività di E₁.

Dalla combinazione questi due effetti risulta che B è sintetizzato con la velocità di $55 \mu\text{moli/min/g}$ di peso di tessuto fresco, e che $5 \mu\text{moli}$ vengono riconvertite nuovamente in A. La sintesi netta di B e quindi di PF risulta così di $50 \mu\text{moli/min/g}$ di peso di tessuto fresco. Alla prima osservazione appare un controsenso sintetizzare da A $55 \mu\text{moli}$ di B per poi convertirne $5 \mu\text{moli}$ nuovamente in A. Cioè il ciclo di substrati "gira" $5 \mu\text{moli/min/g}$ di tessuto fresco. La spiegazione è data in b) ed in c), dove è descritta la migliore ipotesi sul meccanismo di regolazione di una via metabolica contenente un ciclo di substrati.

b) Gli enzimi regolati PM ed E₁, sono ambedue fortemente attivati dall'azione di un ormone, per cui l'attività del ciclo di substrati è molto alta ($1950 \mu\text{moli/min/g}$ di tessuto fresco) se confrontata con la situazione descritta in a). L'azione di attivazione dell'ormone è maggiore su PM che su E₁ (vedere c). Tuttavia l'attività di PM è ridotta da PF, mentre quella di E₁ viene ulteriormente aumentata. Da ciò risulta che la maggior parte di B neosintetizzato è convertita in A. La C_{ss}-PF è aumentata perché all'inizio dell'attivazione ormonale si ha una attività di PM molto maggiore di E (vedere c), per il fatto che la C_{ss}-PF aveva un valore iniziale relativamente basso. Questo valore di C_{ss}-PF era sufficiente a regolare il ciclo (inibire PM ed attivare E₁) in assenza di attivazione ormonale (condizione descritta in a). Essa sarebbe insufficiente a controllare il ciclo quando gli enzimi sono attivati dall'ormone. Tuttavia l'incremento di sintesi di PF, non accompagnato da una sua utilizzazione, causa un incremento della C_{ss}-PF (freccia verso l'alto), che provoca una forte inibizione di PM e contemporaneamente una forte attivazione di E₁. $2000 \mu\text{moli}$ di B vengono sintetizzati ogni minuto e nello stesso tempo $1950 \mu\text{moli}$ di esse sono riconvertite in A, per cui il ciclo di substrato "gira" a $1950 \mu\text{moli}$ al minuto in ogni grammo di tessuto fresco. La velocità di sintesi netta di B e quindi di PF è di $50 \mu\text{moli/min/g}$ di tessuto fresco.

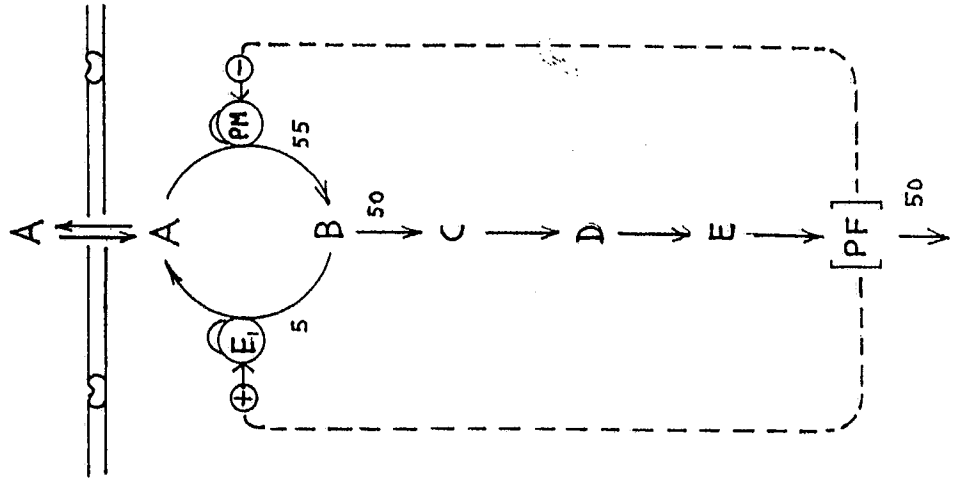
Nonostante il forte incremento (circa 40 volte) della reazione $A \rightarrow B$, la sintesi netta di B non aumenta a causa del simultaneo incremento della reazione che converte B in A

(circa 400 volte). Ciò è opportuno perchè l'utilizzazione di PF da parte della cellula è rimasta costante, cioè uguale a quella in a).

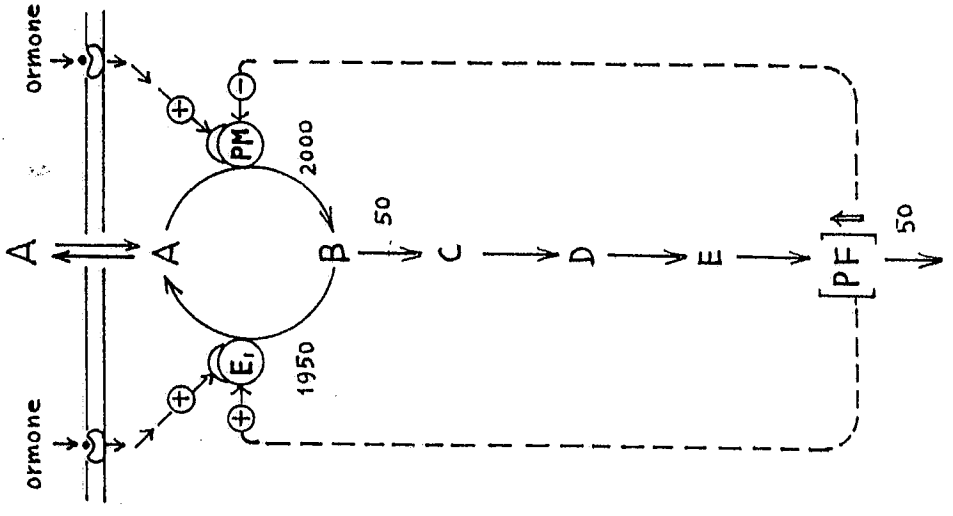
c) In queste condizioni, permane l'attivazione ormonale di PM o di E_1 , ma gli effetti allosterici di PF su PM ed E_1 non sono più presenti, perchè la C_{50} -PF è più bassa (freccia verso il basso) rispetto a quella descritta in fig. b, a causa della forte utilizzazione di PF. PM ha un forte incremento di attività catalitica perchè è ancora sotto l'effetto di attivazione ormonale e non è inibito da PF. Ciò porta la velocità della reazione $A \rightarrow B$ a $51.000 \mu\text{moli/min/g}$ di tessuto fresco.

E_1 è ancora attivato dall'ormone ma è meno attivato da PF, per cui la sua attività risulta inferiore a quella che E_1 aveva nella condizione descritta in b, e la velocità di riconversione di B in A si riduce a $1000 \mu\text{moli/min/g T.F.}$ Da ciò risulta un grande effetto sulla velocità di sintesi netta di B e così della sintesi di PF, che è ora di $50.000 \mu\text{moli/min/g T.F.}$ Cioè circa 1000 volte maggiore di quella basale descritta in a).

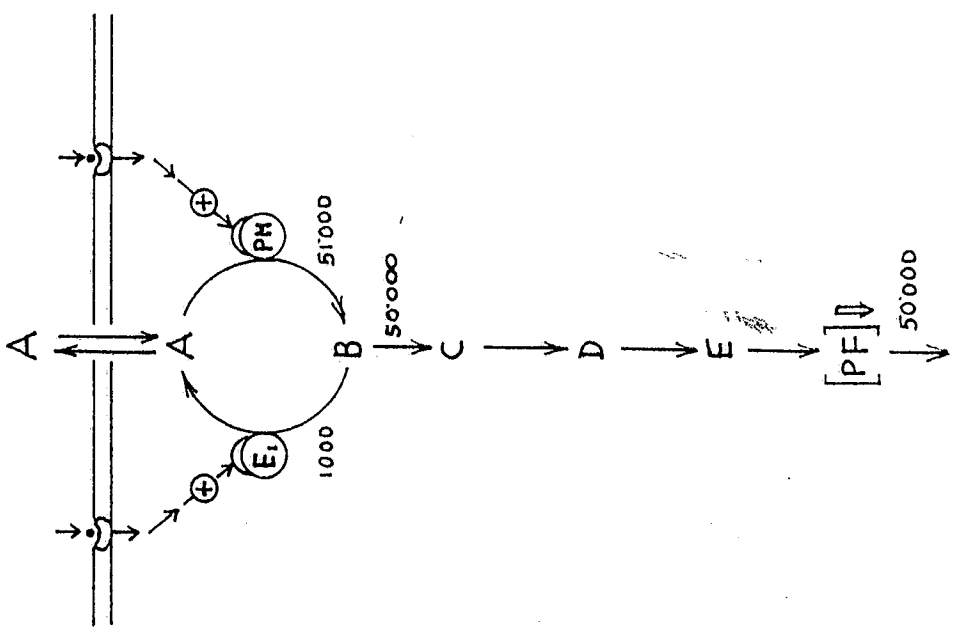
Se non ci fosse il ciclo di substrati, cioè la reazione che converte B in A, l'attivazione della via metabolica non potrebbe essere così grande per semplice azione di disinibizione di PM, perchè non potrebbe essere operata l'azione preparatoria dell'ormone (indicata in b, incremento di attività di PM senza incremento della sintesi di PF). Se non ci fosse la regolazione da effettore su PM ed E_1 il ciclo di substrati sarebbe un "ciclo futile", cioè tutto il B neosintetizzato sarebbe riconvertito in A.



(a)



(b)



(c)

Fig. 5-7

FUNZIONI DELLE PROTEINE
E
MECCANISMI MOLECOLARI
DELLA REGOLAZIONE
DELL'EMOGLOBINA E DEL METABOLISMO UMANO

PREMESSA

Gli esseri viventi sono costituiti da molecole, piccole molecole (metaboliti semplici e complessi) e da macromolecole (polimeri di metaboliti). La struttura stabile di queste molecole è costituita da 6 specie di atomo (C, H, O, N, P, S) uniti da legami covalenti.

I meccanismi molecolari di regolazione presenti negli esseri viventi operano attraverso cambiamenti di concentrazione di molecole e per cambiamenti di affinità tra molecole. I cambiamenti di concentrazione interessano piccole molecole e macromolecole ed i cambiamenti di affinità interessano le reazioni di associazione (reazioni che avvengono mediante la formazione di interazioni deboli) tra proteine e piccole molecole e tra proteine e macromolecole (proteine, acidi nucleici, carboidrati). Questi cambiamenti di concentrazione e di affinità risultano in cambiamenti nello stato di equilibrio o nella tendenza a raggiungere l'equilibrio di reazioni di associazione al fine poi di rallentare o di accelerare il raggiungimento dell'equilibrio di reazioni covalenti mediante cambiamenti di concentrazione dei reagenti e di attività di catalisi degli enzimi.

Le reazioni covalenti sono classificabili in tre gruppi:

- a) reazioni di fosforilazione e di defosforilazione delle proteine. Queste reazioni realizzano rispettivamente la legatura di un gruppo fosfato ceduto dall'ATP, ad un residuo di serina, treonina o tirosina, di una proteina e l'idrolisi dello stesso gruppo dagli stessi residui. Queste reazioni fanno parte del meccanismo molecolare di regolazione dell'attività biologica delle proteine operato dagli ormoni, fattori di crescita ed, almeno in due casi da effettori.
- b) reazioni cataboliche che degradano le macromolecole in piccole molecole (metaboliti) e poi le piccole molecole in anidride carbonica, acqua, urea ed altre molecole di escrezione con conservazione dell'energia libera nei legami fosfo-anidridici dell'ATP e GTP.
- b) reazioni anaboliche che da metaboliti semplici portano alla formazione di molecole organiche più o meno complesse (metaboliti complessi: trigliceridi, fosfolipidi, basi puriniche e pirimidiniche, ecc. e mediatori di regolazione: cAMP, inositolo-trifosfato, ecc.) e di macromolecole (glicogeno, proteine, RNA, DNA).

Queste molecole e macromolecole sono i componenti cellulari che costituiscono le proprietà funzionali e strutturali

delle cellule e degli organi subcellulari, delle strutture extracellulari che permettono l'aggregazione delle cellule in tessuti ed organi fino alla costituzione dell'organismo. La cellula, gli organi e l'organismo non sono altro che un insieme di prodotti finali di molte vie metaboliche. L'esistenza e la regolazione delle vie di sintesi e di degradazione di questi prodotti finali, è il risultato di un ordinato giuoco di spostamenti di equilibri di reazioni covalenti controllate da reazioni di associazione tra proteine e molecole.

Due tipi di stimolo attivano i meccanismi molecolari di regolazione degli esseri viventi.

Uno è la continua richiesta di energia che viene presa dall'esterno sotto forma di molecole (alimenti). Una volta introdotti nell'organismo, gli alimenti inducono le cellule di tessuti ed organi a rispondere alla loro introduzione. La risposta è automatica e diversa in relazione alla natura chimica degli alimenti, al tipo di cellula stimolata ed in relazione allo stato di differenziamento della cellula stessa.

Gli altri tipi di stimolo provengono dall'ambiente e sono mediati dagli organi di senso e dal sistema nervoso. Il sistema nervoso agisce sulle cellule direttamente e/o via il sistema ormonale.

Il perchè ed il come delle risposte di un organismo ai due tipi di stimolo, è nella costituzione genetica dell'organismo stesso, cioè nel modo in cui è costruita la macchina biologica. Essa è costruita per esecuzione di un programma scritto nel DNA della cellula uovo fecondata e condizionato nel tempo dall'alimentazione e dall'ambiente fisico, chimico e culturale. Nell'ambito di uno stesso organismo il programma è identico ma la regolazione della sua realizzazione è diversa in cellule di tipo diverso e può essere diversa in cellule dello stesso tipo in tempi diversi in relazione ad indicazioni del programma stesso (sviluppo embrionale, organogenesi), all'alimentazione ed all'azione dell'ambiente (radiazioni, composti inquinanti ecc.).

CAPITOLO 6

Proteine deposito.

Le proteine deposito sono proteine localizzate all'interno delle cellule, la loro capacità di associare specificamente e reversibilmente piccole molecole ad ioni monoatomici ha la funzione di trattenere all'interno della cellula, una quantità di legante molto superiore a quella data dalla solubilità del legante stesso nel citoplasma.

Nella cellula ci sono due insiemi (pool) di legante: uno di legante libero che ha il limite massimo della solubilità dello stesso nel citoplasma, e l'altro associato alla proteina di deposito. Questo secondo pool è limitato al numero delle molecole di deposito presenti nella cellula e dal valore dell'affinità della proteina di deposito verso il legante. In genere l'affinità verso il legante è molto alta per cui il limite al numero di molecole di legante depositabili è il numero di molecole della proteina deposito.

La proteina deposito associa il legante quando è presente in eccesso, e lo cede quando la concentrazione del legante si abbassa. Questo è possibile perchè il complesso proteina deposito-legante è in equilibrio (rapido e reversibile) con le forme libere della proteina e del legante. La formazione e la dissociazione del complesso sono governate dalle variazioni della concentrazione del legante. Anche variazioni della concentrazione della proteina fanno variare la concentrazione del complesso, tuttavia nelle cellule le variazioni della concentrazione di una proteina avvengono in tempi più lunghi. La sintesi di una proteina richiede molte reazioni (attivazione ed espressione del relativo gene, trascrizione, maturazione del mRNA, traduzione e modificazioni post-traduzionali). L'inibizione della sintesi di una proteina porta alla riduzione della sua concentrazione cellulare perchè le proteine vengono continuamente degradate e risintetizzate (turnover) e la loro concentrazione cellulare risulta dai valori relativi delle velocità di sintesi e di degradazione della proteina stessa. La concentrazione cellulare delle proteine, come di ogni altro composto (eccetto il DNA, Hb ed altre molecole nei globuli rossi) è allo stato stazionario e può essere regolata regolando la sintesi della proteina stessa. Quando la sintesi della proteina è repressa, la proteina per azione delle proteasi viene degradata più o meno velocemente, in relazione alla natura molecolare della proteina stessa. Anche questo processo richiede tempi lunghi, può essere accelerato dall'azione di ormoni, tuttavia può richiedere alcune ore.

Quindi la variazione della concentrazione della proteina di deposito è un adattamento, cioè una regolazione che richiede tempi lunghi. In genere l'adattamento è conseguente ad una condizione metabolica protratta nel tempo. Ad esempio, una permanenza ad alta quota (ipossia) per alcune settimane porta ad un incremento di globuli rossi e quindi di Hb, al fine di trasportare più O_2 . Mentre in tempi più brevi di ipossia viene cambiata l'affinità dell'Hb variando la concentrazione di una piccola molecola (DPG), che può essere sintetizzata rapidamente.

Le fluttuazioni di concentrazione del legante possono essere molto rapide (frazioni di secondo) ed in dipendenza di questa fluttuazione, la concentrazione del complesso proteina deposito-legante varierà altrettanto rapidamente, al fine proprio di evitare che la concentrazione del legante libero si allontani dalla norma per tempi troppo lunghi.

Nella cellula le concentrazioni dei metaboliti ed ioni, variano entro valori molto vicini. Se le concentrazioni si abbassano troppo, si rallentano ad esempio le reazioni enzimatiche in cui metaboliti e ioni sono coinvolti, se si innalzano troppo, possono divenire inibitori fisiologici di altre proteine a cui si associano casualmente proprio perchè la loro concentrazione è aumentata troppo.

Si assume che le proteine di deposito per alcune specie di legante, abbiano la funzione di evitare la carenza e/o l'eccesso del legante. Ad esempio, la Mb è la proteina deposito di O_2 nelle fibre muscolari. Se la Mb non fosse presente, non ci sarebbe riserva di O_2 ed il metabolismo aerobico della fibra sarebbe limitato alla quantità di O_2 in soluzione. Del resto, per avere una riserva di O_2 senza Mb, la concentrazione di O_2 nelle fibre dovrebbe essere molto alta. Le alte concentrazioni di O_2 causerebbero ossidazioni accidentali (non fisiologiche) di componenti cellulari.

Un altro esempio è la ferritina, proteina deposito del Fe^{2+} , presente in tutte le cellule. Essa ha la funzione di trattenere il Fe^{2+} proveniente dagli alimenti e recuperare il Fe^{2+} liberato dai gruppi prostetici o dalle proteine degradate durante il loro normale turnover. Inoltre, l'eccesso di Fe^{2+} libero può essere dannoso.

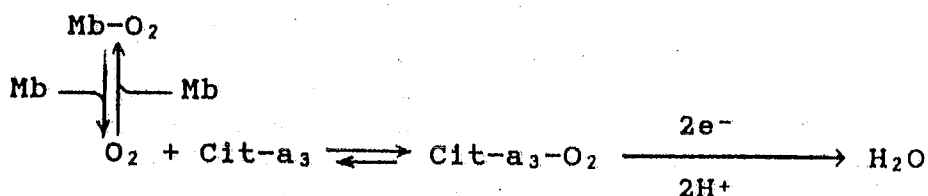
Si assume che la concentrazione fisiologica di un legante che è corredato di una proteina deposito, oltre che essere in relazione alla affinità e concentrazione della proteina deposito, lo è anche alla concentrazione ed affinità della proteina (e) che lo utilizza per funzioni metaboliche (es. enzimi). Ad esempio, l' O_2 è quasi totalmente utilizzato dalla citocromossidasi mitocondriale, che lo utilizza come accettore degli elettroni nella fosforilazione ossidativa. I tessuti che non contengono Mb sono riforniti di O_2 dal sistema circolatorio in quantità sufficienti ad associarsi alla citocromossidasi, per cui l'attività dell'enzima è tale da soddisfare la respirazione molecolare in relazione

alle esigenze metaboliche della cellula.

Le fibre muscolari rosse, che in attività prolungata richiedono quantità relativamente grandi e costanti di O_2 , hanno come proteina di riserva la Mb. La presenza di Mb evita eventuali fluttuazioni della pO_2 intracellulare dovute alle variazioni della circolazione ematica, della respirazione, nei periodi di apnea, nei momenti di incremento del metabolismo ossidativo.

La Mb ha un'alta affinità per l' O_2 ($K_{aff} = 10^6$, che alle pO_2 tissutali è superiore a quella della Hb, proteina trasportatrice di O_2 , presente nei globuli rossi. La Mb per la sua alta concentrazione ed affinità per l' O_2 , favorisce l'entrata di O_2 nelle fibre muscolari, anche in quelle che ricevono un sangue relativamente povero di O_2 (fig. 6-4). La Mb poi lo ricede alla citocromossidasi (Cit-a₃) in relazione alle quantità utilizzate dall'enzima.

Ciò è possibile perchè esiste sempre una certa quantità di O_2 libero in soluzione e perchè esistono opportune proporzioni di valori di affinità verso l' O_2 e di concentrazione della Mb e della citocromossidasi. I valori di affinità e di concentrazione di Mb e della citocromossidasi sono geneticamente determinati, cioè sono frutto della selezione naturale e quindi codificati nel DNA delle cellule.



Ad esempio, se la quantità di molecole Mb fosse scarsa e l'affinità per l' O_2 delle stesse molecole fosse alta rispetto a quelle della Cit-a₃, la funzione di deposito della Mb sarebbe persa e l'enzima potrebbe utilizzare l' O_2 legato alla Mb solo quando la concentrazione dello O_2 fosse molto bassa. Di conseguenza l'enzima sarebbe poco attivo perchè scarsamente saturato da O_2 . Quindi proteine deposito (Mb) e proteina che utilizza (Cit-a₃) il legante (O_2) devono avere valori di concentrazioni e di affinità tali che il sistema di equilibri indicato nello schema possa funzionare in relazione alle richieste metaboliche ed in presenza di fluttuazioni dell'apporto di O_2 . La funzione dell'Mb è molto importante perchè la fosforilazione ossidativa può funzionare solo in presenza di opportune concentrazioni di O_2 .

La Mb è una proteina monomerica (153 aminoacidi) con un gruppo prostetico detto EME, costituito da una molecola organica (protoporfirina IX) e da un atomo di Fe^{2+} . Il Fe^{2+} forma quattro legami di coordinazione con la protoporfirina IX, uno con un residuo di istidina della proteina.

Questi cinque legami di coordinazione sono stabili (fig. 5-1). Il ferro forma un sesto legame di coordinazione con l'ossigeno, questo legame è facilmente spezzato alla T di 37°C. Per cui l'associazione della Mb con l'O₂ è veloce e velocemente reversibile come richiesto per la funzione di deposito della Mb. La costante cinetica di associazione (k_1) è molto grande, $10^{-7} \text{ M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$, e la costante cinetica di dissociazione (k_2) è $10 \cdot \text{sec}^{-1}$. La curva di associazione della Mb con l'O₂ è iperbolica (vedere fig. 6-3). La concentrazione della Mb nelle fibre muscolari può variare. L'esercizio muscolare aerobico (corse di su lunghe distanze) fa aumentare la quantità di Mb nelle fibre esercitate, mentre la Mb diminuisce negli arti non utilizzati. L'aumento della quantità di Mb all'interno di una fibra, fa aumentare le capacità aerobiche della fibra stessa. Tuttavia le variazioni di [Mb] richiedono tempi relativamente lunghi per essere apprezzabili. Appare non conveniente per l'organismo avere grosse variazioni di [Mb] per pochi giorni di inattività o di attività muscolare.

Proteine di trasporto

Sono definite proteine di trasporto le proteine presenti in soluzione nel sangue che hanno la capacità di associare reversibilmente ioni monoatomici o molecole. La loro funzione molecolare non è tanto il trasporto per se, perchè le molecole o gli ioni liberi in soluzione o associati alle rispettive proteine di trasporto, sono trasportati dal flusso del sangue, tutti alla stessa velocità. Le proteine di trasporto incrementano il numero di molecole (o ioni) presenti per unità di volume di sangue. Quindi le proteine di trasporto incrementando la quantità del legante presente in soluzione, ne incrementano la quantità trasportata per unità di volume di sangue.

Altre proteine, definite di trasporto, sono poste sulle membrane (cellulari, mitocondriali, e di altri organelli cellulari), ed interagendo con ioni monoatomici o molecole ne permettono il passaggio attraverso la membrana stessa. Queste proteine regolano il passaggio e quindi la velocità del flusso delle molecole attraverso la membrana. Questo tipo di trasporto può richiedere energia che in genere è fornita dall'ATP. Le proteine di trasporto hanno alta affinità verso il proprio legante e possono avere alta specificità, associare cioè un solo tipo di molecola.

Le proteine di trasporto presenti nel sangue esercitano la loro funzione associando il legante nelle zone del sistema circolatorio, in cui è più abbondante perchè rilasciato dalle cellule che lo producono (es. acidi grassi dagli adipociti) o che ne permettano il passaggio (es. O₂ che passa attraverso le cellule dei capillari polmonari) alle cellule che utilizzano il legante (es. acidi grassi utilizzati dal cuore, O₂

utilizzato da tutte le cellule aerobiche).

La proteina di trasporto, per azione di massa, assume il legante dove è abbondante e lo cede dove è meno concentrato. Ciò è possibile perchè, anche se la proteina di trasporto ha un'alta affinità per il legante, è in equilibrio rapido e reversibile con il legante libero, e quindi il complesso proteina di trasporto-legante, varia in concentrazione rapidamente in relazione al fluttuare della concentrazione del legante libero.

Il complesso proteina di trasporto-legante, anche se si dissocia e si riforma molte volte al secondo, può assolvere alla sua funzione di trasporto anche per tempi superiori alla vita del complesso stesso e quindi trasportare il legante per un percorso lungo quanto il sistema circolatorio.

Prendiamo come esempio l'albumina (Al), proteina che trasporta nel sangue varie specie di molecole, inclusi gli acidi grassi a lunga catena (AG). Per semplicità consideriamo che l'albumina sia uniformemente distribuita nel sangue e che associ una sola molecola di acido grasso. In realtà l'albumina può associare due molecole di acido grasso con alta affinità ed altre con minore affinità ed inoltre non è specifica per la specie molecolare dell'acido grasso che può essere a 16 o più atomi di C, saturo od insaturo. Se nel tessuto adiposo c'è una attiva degradazione di trigliceridi, gli acidi grassi liberati si riverteranno nei capillari che irrorano il tessuto. In questi capillari, l'albumina trasportata dal sangue sarà esposta ad un'alta concentrazione di acidi grassi, ed in virtù dell'affinità che Al ha per gli AG, si formeranno rapidamente molti complessi Al-AG. Quando sono ancora dove si sono formati, nel capillare del tessuto adiposo, alcuni complessi Al-AG si dissocieranno ma si riformeranno di nuovo dato che l'alta concentrazione di AG liberi è rimasta invariata. Con la circolazione del sangue, l'albumina complessata con acidi grassi finirà per passare attraverso capillari che irrorano cellule in cui la concentrazione degli AG liberi è inferiore a quella degli AG ematici.

In questo nuovo distretto, gli acidi grassi liberi tenderanno a spostarsi all'interno delle cellule per gradiente di concentrazione, per cui un certo numero di complessi Al-AG si dissocierà e non si riformerà perchè la concentrazione degli AG liberi nel sangue si è abbassata a causa della diffusione di AG nelle cellule irrorate dai capillari. Ciò provocherà una ulteriore dissociazione dei complessi Al-AG che ristabilirà la concentrazione iniziale di AG liberi, e così avanti nella circolazione finchè l'albumina sarà prevalentemente nella forma libera. Se il rilascio di AG da parte delle cellule adipose continua, la concentrazione degli AG liberi e dei complessi Al-AG aumenterà progressivamente nel sangue, tendendo ad uniformarsi. Nei capillari che irrorano le cellule che utilizzano AG, si abbasserà perchè in queste cellule e negli spazi interstiziali la concentrazione allo stato stazionario di AG (C_{ss}-AG) sarà più bassa.

Infatti la diffusione degli AG nel sangue verso gli spazi interstiziali e le cellule, non sarà compensata da un flusso di AG in senso inverso, come invece avviene nelle cellule che non utilizzano AG. L'abbassamento locale della C_{ss}-AG causa la dissociazione dei complessi Al-AG che tenderà a ristabilire la C_{ss} degli AG liberi e quindi a favorire l'ingresso di AG nelle cellule che li utilizzano. Il trasporto degli AG da parte dell'albumina, avviene anche se l'AG rimane legato alla proteina per tempi brevi perchè, quando i complessi Al-AG si dissociano in distretti ematici in cui la concentrazione degli AG liberi risulta uguale o superiore a quella in cui si erano formati, i complessi Al-AG si riformano. In questi distretti cellule e spazi interstiziali hanno C_{ss}-AG uguali ed in equilibrio con la C_{ss}-AG ematica. Nella circolazione, questo ping pong molecolare può avvenire molte volte se la C_{ss}-AG rimane costante e quindi il trasporto degli AG continua. Quando il sangue attraversa capillari in cui la C_{ss}-AG viene diminuita dal flusso degli AG verso le cellule, i complessi Al-AG si dissocieranno non riformandosi ed assolvendo così alla loro funzione di trasporto. E' proprio la facilità di dissociazione del complesso che permette il rilascio del legante, dove la concentrazione del legante stesso è più bassa.

Il meccanismo molecolare di trasporto di un legante è basato su un definito valore di affinità della proteina (Al) verso il legante (AG); questo valore deve essere sufficientemente alto da formare, in presenza di alte concentrazioni fisiologiche di legante, un numero di complessi proteina-legante molto vicino al numero di molecole di proteina di trasporto (al fine di evitare di avere molecole di proteina non utilizzate perchè non complessate); tuttavia l'affinità non deve essere troppo alta perchè ciò consentirebbe un minore e più lento rilascio di legante quando la concentrazione del legante si abbassa. Risulta che anche con affinità relativamente alte i complessi si dissociano e si formano molte volte durante il trasporto (vedere Cap. 2).

Gli acidi grassi liberi sono normali costituenti del sangue perchè sono utilizzati per sintesi e per produzione di energia libera in tutte le cellule (eccetto il SNC, perchè la barriera emato-encefalica è impermeabile agli AG), per cui nel sangue è sempre presente una certa concentrazione di complessi Al-AG. La concentrazione di AG nel sangue, e quindi di complessi Al-AG aumenta in condizioni di richiesta energetica (sforzo muscolare prolungato) o per risparmiare glucosio (digiuno, diete ipoglucidiche), proprio per rifornire le cellule di queste molecole.

Abbiamo visto che il trasporto di un legante operato da una proteina non regolata, è basato sullo spostamento dell'equilibrio della reazione di associazione tra proteina e legante. Se un tessuto utilizza il legante si avrà come conseguenza un abbassamento della concentrazione del legante all'interno delle cellule di

quel tessuto, che richiamerà più legante dal sangue secondo il meccanismo molecolare indicato sopra e nella fig. 6-2. Quindi il rilascio del legante da parte della proteina di trasporto è passivo. Con proteine di trasporto regolate, il complesso proteina-legante può essere indotto a rilasciare il legante, anche se la concentrazione del legante libero è costante, per azione specifica di effettori liberati dalle cellule che utilizzano il legante trasportato.

Emoglobina, proteina di trasporto regolata da effettori e dotata di associazione cooperativa del legante-substrato.

L'emoglobina (Hb) è la proteina di trasporto dell'ossigeno molecolare (O_2), è contenuta in alta concentrazione nei globuli rossi, occupandone quasi tutto il volume.

Ci sono circa $280 \cdot 10^6$ molecole di Hb in un globulo rosso, circa 10^{12} globuli rossi in un litro di sangue, $14 \cdot 10^{20}$ molecole di Hb in un litro di sangue. Il volume del sangue di un uomo di 70 Kg è circa l'8% del peso corporeo, che corrisponde a 5,6 litri (di cui 3,1 litri sono di plasma e 2,5 litri di globuli rossi). Nel sangue circolante di un uomo di 70 Kg ci sono circa $8 \cdot 10^{21}$ molecole di Hb, corrispondenti ad un peso di circa 900 gr di Hb pura.

Se si confronta il numero delle molecole di Hb presenti in un solo uomo ($8 \cdot 10^{21}$) con il numero degli uomini sulla terra (meno di 10^{10}) e con le stelle della nostra galassia (10^{21}), si capisce come il sangue riesca a trasportare dai polmoni ai tessuti di un uomo in riposo, 250 ml di O_2 al minuto, pari a 360 litri di O_2 al giorno. L'emoglobina è un tetramero costituito da 2 subunità uguali, dette α (141 aminoacidi) e da altre due subunità uguali tra loro dette β (146 aminoacidi). Tra le subunità α e β esiste una certa analogia di sequenza: 84 differenze di residui aminoacidici tra le loro sequenze e rispettivamente 115 e 118 differenze con la Mb. Tuttavia esiste una grande similarità tra le strutture tridimensionali della subunità α , β e della Mb (fig. 6-1 e 6-3). Ogni subunità α e β (come la Mb) ha come gruppo prostetico l'eme (fig. 6-1c). Il Fe^{2+} forma 4 legami di coordinazione con la protoporfirina IX, un quinto legame con residui di istidina rispettivamente di ciascuna subunità α e β . Il Fe^{2+} è l'atomo che lega reversibilmente l' O_2 con il sesto legame di coordinazione.

L'Hb associa 4 molecole di O_2 , una per ogni subunità, tramite i rispettivi gruppi prostetici. L'Hb è dotata di associazione cooperativa dell' O_2 ed è regolata da quattro effettori negativi: H^+ , CO_2 , 2,3 difosfoglicerato (DPG) e Cl^- . Tutti questi effettori si legano a residui della proteina con legami deboli, ad eccezione della CO_2 che si lega mediante un legame covalente (carboamidico) con i gruppi $-NH_2$ terminali delle quattro subunità.

La Hb ha la curva di saturazione da O_2 sigmoide, e l'azione degli effettori, indipendentemente l'uno dall'altro (cioè è sufficiente incrementare la concentrazione di un solo effettore), sposta questa curva verso destra facendo aumentare l'effetto cooperativo e quindi la sigmoidicità della curva (figg. 6-4+6-6).

L'associazione cooperativa dell' O_2 e l'azione degli effettori sull'Hb, hanno funzioni molto importanti per il trasporto dell' O_2 e della CO_2 . Queste funzioni saranno esaminate per prime, successivamente sarà illustrato il meccanismo molecolare tramite il quale si realizzano.

L'emoglobina è la proteina meglio conosciuta sia nella funzione che nella struttura molecolare. Conoscendo i suoi meccanismi d'azione e di regolazione si ha la visione della relazione esistente tra struttura e funzione della molecola proteica e di come piccoli cambiamenti di conformazione risultino in variazioni dell'attività biologica.

Funzione fisiologica dell'effetto cooperativo dell'emoglobina.

L'Hb essendo dotata di cooperatività positiva verso l'O₂, se confrontata con una proteina che associa O₂ non cooperativamente (Mb, fig. 6-4 e Cap. 3) mostra una risposta amplificata nell'assunzione e rilascio di O₂ per variazione di C_{ss}-O₂ aventi alti valori assoluti.

La funzione fisiologica dell'associazione cooperativa dell'O₂ da parte dell'Hb è nella sua dissociazione, cioè nel rilascio di opportune quantità di O₂ a livello dei tessuti, piuttosto che nella sua ossigenazione. Infatti, in condizioni normali, a livello degli alveoli polmonari, l'Hb si satura di O₂ (~98%) e ciò avviene, anche se con un diverso andamento (curva di saturazione iperbolica), anche per proteine non dotate di effetto cooperativo (fig. 6-4).

L'Hb satura di O₂ giunta ai capillari dove avviene lo scambio gassoso (O₂ e CO₂, fig. 6-7), può rilasciare circa il 50% di O₂ trasportato (circa il 50% di molecole Hb-O₂ si dissocia) a pO₂ tissutali (pO₂ ~26mm Hg), che sono inferiori a quelle polmonari (pO₂ ~100mm Hg), ma opportunamente alte da permettere l'ossigenazione dei tessuti anche in condizioni di alta attività ossidativa (es. muscoli durante l'esercizio aerobio, fig. 7-19). La stessa quantità di O₂ non potrebbe essere rilasciata a livello dei tessuti da una proteina non dotata di effetto cooperativo (es. Mb, fig. 6-4) per la stessa caduta di pO₂ (da 100 a circa 26mm Hg). Utilizzando come trasportatore di O₂ la Mb (al posto della Hb), per avere a livello dei tessuti la dissociazione della stessa quantità di O₂, bisognerebbe scendere a pO₂ molto più basse, non fisiologiche perchè insufficienti a sostenere il metabolismo ossidativo (sintesi di ATP); oppure, mantenendo le stesse pO₂ tissutali, occorrerebbe ridurre il metabolismo ossidativo dei tessuti a circa un terzo (dato la minore quantità di O₂ dissociato); oppure incrementare la circolazione sanguigna a livelli non fisiologici.

Quando l'Hb-O₂ (nei globuli rossi) percorre un capillare che irrori cellule ad alto metabolismo aerobico, per cui si ha un'alta utilizzazione di O₂ ed una pO₂ relativamente più bassa, l'HbO₂ si dissocia proporzionalmente per ripristinare l'abbassamento locale di pO₂. L'effetto cooperativo ha quindi la funzione di ridurre l'affinità dell'Hb verso l'O₂ in relazione diretta con la deossigenazione. Maggiore è la caduta

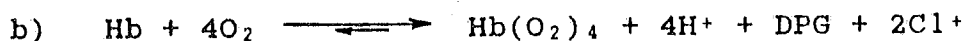
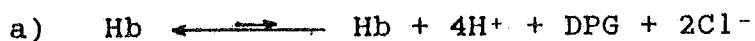
della pO_2 a livello di un dato capillare, e maggiore è la caduta di affinità dell'Hb verso l' O_2 , in modo che sia rilasciata la quantità di O_2 necessaria alle cellule irrorate dal capillare. La caduta di affinità corrisponde all'aumento dell'apertura del rubinetto di un recipiente. Anche se il recipiente contiene lo stesso volume di liquido, l'apertura maggiore fa rilasciare più liquido nell'unità di tempo. Le concentrazioni dell' O_2 libero nei globuli rossi, sangue, spazi tra vasi e cellule, sono tutti allo stato stazionario. Quando le cellule irrorate dal capillare utilizzano una data quantità di O_2 , la pO_2 nelle cellule si abbasserà e questo farà spostare l' O_2 dagli spazi vicini, e così avanti fino al globulo rosso. L'abbassamento della pO_2 nel globulo rosso, causa la dissociazione dell'Hb- O_2 nella quantità giusta a ristabilire la pO_2 nella cellula o gruppo di cellule che hanno provocato il flusso di O_2 dal globulo rosso alle cellule stesse. La velocità di diffusione dell' O_2 è molto alta, molto più alta della velocità del flusso sanguigno, per cui l' O_2 passa rapidamente dai globuli rossi alle cellule che lo utilizzano in virtù del gradiente di concentrazione.

Sommario.

La dissociazione cooperativa dei complessi HbO_2 ha due funzioni:

- 1) ridurre l'affinità dell'Hb verso l' O_2 in relazione diretta allo stato di deossigenazione dell'Hb, al fine di poter cedere O_2 ai tessuti nelle quantità necessarie in relazione alla pO_2 locale.
- 2) conferire al HbO_2 la possibilità di cedere O_2 alle pO_2 dei tessuti che devono essere mantenute relativamente alte al fine di sostenere il metabolismo aerobico.

La presenza dell'associazione cooperativa dell' O_2 indica che esistono almeno due forme (conformazioni) di Hb con differenti affinità per l' O_2 ed in equilibrio tra loro (figg.6-8+6-11). In assenza di O_2 la forma più stabile è la deossi-Hb, mentre in presenza di $[O_2]$ saturanti l'Hb, la forma più stabile è la ossi-Hb. La deossi-Hb è stabile se ha associato l' O_2 sulle quattro subunità ed ha perso $4H^+$, $2Cl^-$ ed una molecola di 2,3diPGA.



In a e b, le frecce indicano sia l'equilibrio di conformazione (tra Hb-deossi e Hb-ossi), sia rispettivamente quello di associazione e dissociazione dei leganti fisiologici della Hb. Queste reazioni non avvengono in un solo evento (vedere dopo), sono qui indicate per mostrare come le concentrazioni allo stato stazionario di H^+ , Cl^- e DPG influenzino l'equilibrio di

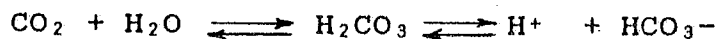
conformazione della Hb e quindi l'affinità dell'Hb verso l'O₂. Anche la CO₂, che (si lega covalentemente all'Hb, stabilizza la Hb-deossi figg. 6-8c, 6-13e,f, 6-14g,h).

Funzione fisiologica della riduzione dell'affinità dell'Hb verso l'O₂, per azione del H⁺ (effetto Bohr).

La riduzione dell'affinità della Hb verso l'O₂ per azione del H⁺ è detta effetto Bohr.

L'incremento della C_{ss}-H⁺ (abbassamento del pH) nel globulo rosso causa una diminuzione dell'affinità dell'Hb con conseguente rilascio di O₂ (fig. 6-5+6-6).

Gli H⁺ sono un normale prodotto del metabolismo aerobico. Il metabolismo aerobico produce una mole di CO₂ per ogni mole di atomi di C dei metaboliti che viene ossidata. La CO₂ forma con l'acqua l'acido carbonico che ai pH fisiologici (circa 7) è completamente dissociato e produce protoni.



La reazione della CO₂ con l'H₂O è covalente ed è catalizzata dalla anidrasi carbonica, un enzima del globulo rosso che ha un altissimo numero di turnover (6x10⁵ trasformazioni al secondo per molecola di enzima), per cui la concersione della CO₂ in acido carbonico è molto veloce.

Le molecole di CO₂ fuoriescono dalle cellule che le hanno prodotte, entrano nel sangue e quindi nei globuli rossi. In queste cellule, la CO₂ reagisce rapidamente con l'acqua per la presenza dell'anidrasi carbonica. La stessa reazione è pressochè inesistente nel plasma a causa dell'assenza dell'enzima. Le molecole di acido carbonico si dissociano rapidamente in ione bicarbonato e protoni, i protoni si legano all'Hb ossigenata favorendo la sua conversione nella conformazione deossi, causando così un ulteriore rilascio di O₂ senza che la pO₂ debba abbassarsi. I grafici in fig. 5-5 mostrano che alla stessa pO₂ (es. 26 mm di Hg), la Hb è più deossigenata se il pH è fisiologicamente acido (pH 7,2). Quindi variando il pH da 7,6 a 7,2 si può avere rilascio di O₂ senza variare la pO₂.

La principale funzione dell'effetto di Bohr è quella di far rilasciare più O₂ a livello delle cellule con maggiore metabolismo ossidativo momento per momento e capillare per capillare. E' un sistema di regolazione semplice, efficace e mirato a cedere più O₂ alle cellule che lo utilizzano di più. Maggiore è l'utilizzazione di O₂ da parte della cellula e maggiore è la produzione di CO₂ e quindi di H⁺ all'interno del globulo rosso.

Quando la mano sinistra è ferma sul tavolo e la destra scrive con movimenti lenti (aerobici), la mano destra utilizza, nell'unità di tempo, una quantità maggiore di ossigeno rispetto a quello utilizzato dalla mano

sinistra, al fine di produrre una maggiore quantità di ATP nell'unità di tempo per sostenere le contrazioni dei muscoli. La maggiore quantità di O_2 sarà rilasciata nei capillari della mano destra che irrorano le fibre che si contraggono, perchè la $Hb-O_2$ dei globuli rossi che circolano in questi capillari si dissocierà in quantità maggiore perchè esposta ad una maggiore $Css-H^+$ (abbassamento del pH). L'incremento della $Css-H^+$ nei globuli rossi è conseguente ad un maggior rilascio di CO_2 nel sangue da parte delle fibre che si contraggono.

L'incremento della CO_2 nel capillare fa aumentare la quantità di molecole di CO_2 che penetrano nei globuli rossi nell'unità di tempo e da ciò risulterà una maggiore attività dell'anidrasi carbonica, con produzione di una maggiore quantità di acido carbonico, e quindi più protoni saranno liberati nell'unità di tempo.

Un'altra condizione metabolica in cui si ha un'alta produzione di protoni, è la glicolisi anaerobica che produce di acido lattico ed avviene nelle fibre muscolari in contrazione rapida.

L'acido lattico deriva dall'ossidazione del glucosio, per cui formandosi il gruppo carbossilico, si ha, con la dissociazione di questo gruppo, la liberazione di un protone. L'azione sull' Hb dei protoni prodotti nella glicolisi anaerobica sembra un controsenso: rilasciare più O_2 per una produzione anaerobica di energia.

Tuttavia la glicolisi anaerobica è una condizione metabolica che può durare al massimo 40 secondi se la fibra si contrae velocemente (es. corsa di 100-200 metri), mentre l'acido lattico rimane presente nel muscolo per vari minuti (fig.7-22). Il rilascio di O_2 da parte dei protoni prodotti anaerobicamente, trova utilità nel riposo della fibra che produrrà ATP per via aerobica e dovrà produrne in più, rispetto ad una fibra che non si è contratta, per sintetizzare glicogeno consumato nelle contrazioni anaerobiche.

Un'altra condizione in cui si ha glicolisi anaerobica è nella contrazione prolungata delle fibre muscolari, quando il metabolismo ossidativo insufficiente a produrre tutto l'ATP necessario per la contrazione (es. nella corsa di 5.000m il 90% dell'ATP è prodotto aerobicamente, circa il 10% anaerobicamente). Anche in questa condizione la produzione di H^+ da acido lattico non è in contrasto con un maggiore rilascio di O_2 da parte dell' Hb .

La maggior quantità di O_2 liberata favorirà la metabolizzazione ossidativa del piruvato che è energeticamente molto più redditizia (38 moli di ATP/mole di glucosio) della glicolisi anaerobica (3 moli di ATP/mole di residuo di glucosio del glicogeno). Quindi, in tutte le utilizzazioni miste di metabolismo aerobico ed anaerobico, la produzione di acido lattico favorisce il metabolismo aerobico, e quindi una riduzione di quello anaerobico che interviene per completare la richiesta di ATP, quando l'ATP prodotto per via aerobica è insufficiente.

Un altro possibile ruolo dell'effetto Bohr è quello di

rendere il sangue già parzialmente deossigenato più disponibile al rilascio di O_2 .

Man mano che il sangue scorre nel capillare, la $Hb(O_2)_4$ cede O_2 alle cellule e diviene progressivamente meno carica di O_2 , mentre il sangue e i globuli rossi accumulano H^+ in conseguenza della CO_2 prodotta dalle cellule (vedere sopra); di conseguenza si ha progressivamente una riduzione di affinità dell' Hb verso l' O_2 , oltre alla riduzione di affinità data dalla cooperatività per riduzione della pO_2 . Quindi le cellule più a valle nel capillare, pur essendo alimentate da una Hb solo parzialmente ossigenata, ricevono ugualmente la quantità di ossigeno a loro necessario perchè nel sangue che li irrorra l' Hb ha meno affinità per l' O_2 a causa dell'incremento di $Css-H^+$. In questo modo, nelle cellule irrorate per prime o per ultime, la pO_2 risulta pressochè identica, e ciò consente una uguale entità di metabolismo ossidativo in ambedue i gruppi di cellule.

In condizioni di metabolismo normale (es. fibre a riposo), in un capillare l' Hb inizialmente cede O_2 prevalentemente per differenza di pO_2 (come se fosse Mb), successivamente, il rilascio di O_2 è incrementato (più che nella Mb) per azione della dissociazione cooperativa. Quando l' Hb è parzialmente ossigenata, diviene importante l'azione dei protoni (fig. 5-5b), perchè il solo effetto cooperativo sarebbe insufficiente a rilasciare l' O_2 in quantità sufficienti a mantenere la pO_2 ai livelli richiesti per la respirazione cellulare. Se non ci fosse l'azione dei protoni, l'ossigenazione delle cellule a cui arriva un Hb parzialmente ossigenata, sarebbe insufficiente. Del resto, se i protoni fossero presenti in eccesso nel sangue ben ossigenato, l' O_2 rilasciato sarebbe eccessivo. Le cellule ossigenate per prime, prendendo O_2 e cedendo H^+ , rendono possibile la normale ossigenazione delle cellule poste più a valle nel capillare (altruismo molecolare).

Quando una fibra muscolare utilizza molto O_2 , i due fenomeni che causano la riduzione dell'affinità dell' Hb verso l' O_2 (cooperatività ed effetto Bohr), possono coesistere a livello della stessa fibra, al fine di rilasciare una grande quantità di O_2 e mantenere un alto valore di pO_2 .

Sommario.

La riduzione dell'affinità dell'Hb verso l'O₂ per azione degli H⁺ ha almeno due funzioni nel trasporto dell'O₂:

- 1) Far rilasciare O₂ in proporzione all'attività metabolica ossidativa delle cellule.
- 2) Ridurre l'affinità dell'Hb parzialmente ossigenata al fine di compensare la riduzione di [Hb(O₂)₄] con una riduzione di affinità dell'Hb verso l'O₂ (es. per cellule irrorate subito dopo altre).

Risulta evidente che l'effetto cooperativo e l'effetto Bohr cooperano per una efficiente distribuzione dell'O₂ e che il solo effetto cooperativo sarebbe insufficiente a tale scopo.

Si assume che le differenze di pO₂ esistenti tra globuli rossi, sangue e tessuti, siano insufficienti (nonostante l'effetto cooperativo) a causare da parte dell'Hb un rilascio di O₂ congruo alle richieste energetiche dei tessuti.

Funzione fisiologica della riduzione dell'affinità dell'Hb verso l'O₂ per azione del 2,3diP-glicerato.

La riduzione dell'attività dell'Hb verso l'O₂ per azione del 2,3diP-glicerato (DPG) (fig.6-6) ha la funzione di favorire il rilascio di O₂, da parte dell'Hb, a livello dei tessuti, quanto l'Hb non viene completamente saturata dall'O₂ a livello dei polmoni e/o quando c'è un considerevole e duraturo consumo di O₂ da parte dei tessuti.

Il tessuto muscolare in contrazioni lente e prolungate nel tempo fa aumentare molto la richiesta di O₂. Durante la maratona, nel tessuto muscolare di un uomo il consumo di O₂ aumenta circa 70 volte (da 2,6 a 180 mmoli di O₂/min).

I motivi dell'incompleta saturazione possono essere:

- a) ridotte pressioni parziali di O₂ nell'aria respirata. In alta montagna, a causa della rarefazione dell'aria, o negli ambienti con scarso ricambio d'aria, dove l'O₂ viene consumato e la CO₂ accumulata dalle persone presenti nell'ambiente, o da motori a combustione, ecc.
- b) ridotta permeabilità all'O₂ degli alveoli polmonari, a causa di stati patologici del polmone come l'enfisema, intossicazioni, ecc.

Quando l'Hb non viene completamente ossigenata, il DPG aumenta automaticamente in concentrazione (da 5 mM a 8 mM circa) nel globulo rosso mediante un meccanismo di regolazione che agisce sulla glicolisi dei globuli rossi in risposta a stati di ipossia. Il tempo necessario per far aumentare la Css-DPG è dell'ordine di ore, e così la caduta della Css-DPG quando l'ipossia cessa. Il tempo di mezza vita del DPG è di circa 6 ore. L'esercizio fa aumentare la Css-DPG in un'ora. Si ipotizza che il maggior consumo di O₂, dovuto all'esercizio muscolare, causi una riduzione della Css-O₂ nel globulo rosso, come negli stati di ipossia, e ciò causi un incremento di DPG nel globulo rosso.

Probabilmente con un meccanismo simile, negli stati in cui la gittata cardiaca è ridotta, si ha un incremento di DPG nel globulo rosso. L'acidosi inibisce la glicolisi e fa diminuire la Css-DPG e forse il pH può avere un ruolo nel controllo della Css-DPG..

Sembra una contraddizione diminuire, mediante il DPG, l'affinità dell'Hb, quando è ossigenata incompletamente a livello dei polmoni, ma come indicato nei paragrafi precedenti, la funzione dell'Hb è di trasportare O₂ in quantità tali da mantenere una pO₂ di circa 26 mm di mercurio a livello dei tessuti.

Se l'Hb è ossigenata incompletamente, l'unico modo per fare sì che rilasci la stessa quantità di O₂ a livello dei tessuti, è quello di diminuirne l'affinità. Se l'affinità dell'Hb fosse aumentata (es. diminuendo la [DPG]), l'Hb si ossigenerebbe completamente o comunque assumerebbe più ossigeno a livello dei polmoni, ma ne rilascerebbe, a livello dei tessuti, meno di quello richiesto e rilasciato con la sua normale affinità per

l'O₂.

Supponiamo di osservare l'ossigenazione di un singolo globulo rosso dove sono incluse 280 milioni di molecole di Hb. Nei polmoni le molecole di Hb sono esposte alla pO₂ di circa 100 mm di Hg. Per semplicità si assume che tutte le molecole di Hb vengano ossigenate (100% di ossigenazione), in realtà si ha una ossigenazione del 96-98% delle molecole di Hb.

Attraverso il sistema circolatorio il globulo rosso lascia i polmoni ed entra in un determinato tessuto dove è esposto a pO₂ più basse, si assume 26 mm di Hg. I complessi Hb(O₂)₄ si dissociano rilasciando O₂ che viene assunta dalle cellule del tessuto. Si assume che l'Hb rilasci il 50% dell'O₂ trasportato, così l'Hb sarà ossigenata globalmente al 50%.

L'Hb ha rilasciato:

$$\frac{280.000.000}{2} \times 4 = 560.000.000 \text{ molecole di O}_2$$

Assumiamo ora che la pO₂ a livello dell'alveolo sia più bassa dei 100mm di Hg e che l'Hb sia ossigenata al 90%, ora solo 252.000.000 di Hb risultano ossigenate e 28.000.000 di Hb non sono ossigenate.

Assumiamo che il globulo rosso raggiunga lo stesso tessuto che nel frattempo non ha cambiato metabolismo e che non siano cambiate la pO₂, la pressione arteriosa, ritmo cardiaco, ecc.

La quantità di O₂ rilasciato a livello di quel tessuto sarà in quantità inferiore, e mancherà l'O₂ non assunto a livello dei polmoni per deficienza di pO₂. Quindi dei 560.000.000 di molecole di O₂ rilasciate normalmente, vanno tolti 112.000.000 di molecole di O₂. Ne saranno rilasciate 480.000.000 se la pO₂ rimane di 26 mm di Hg. Se l'apporto di O₂ è insufficiente, la pO₂ del tessuto si abbasserà e ciò favorirà un maggior rilascio di O₂, tuttavia il tessuto dovrà funzionare con una minore concentrazione allo stato stazionario di O₂, che oltre certi limiti porta ad una riduzione del metabolismo ossidativo. Al fine di ovviare immediatamente alla riduzione di trasporto di O₂, aumenta la frequenza respiratoria e quella cardiaca.

Contemporaneamente, la C_{ss}-DPG aumenta; l'effetto diviene apprezzabile dopo circa 1h e si completa in circa due giorni. L'aumento della C_{ss}-DPG riduce l'affinità per l'O₂ dell'Hb che a livello dei polmoni si ossigenerà in una percentuale inferiore rispetto a quando la concentrazione del DPG era quella normale, ma l'Hb-O₂ potrà dissociarsi a livello dei tessuti, arrivando a percentuali di Hb-deossigenata inferiori, anche in presenza di pO₂ di 26 mm di Hg, e quindi cedendo una quantità di O₂ uguale o molto vicina a quella liberata in condizioni di ossigenazione normale.

Ad esempio, supponiamo che a causa della minore pO₂

alveolare e dell'aumento della concentrazione del DPG, l'Hb si ossigena ora solo all'80%: solo 224.000.000 di Hb saranno ossigenate.

L'abbassamento dell'affinità per l'O₂ causato dall'incremento di concentrazione del DPG, non permette l'ossigenazione di altri 28.000.000 di molecole di Hb (56.000.000 in totale). Tuttavia la conseguente riduzione di affinità permette uno spostamento dell'equilibrio di ossigenazione dell'Hb tale che, pur essendo meno ossigenata, l'Hb rilascia alla stessa pO₂ (26 mm di Hg considerati in questo esempio) la stessa quantità di O₂ che rilasciava in condizioni normali, scendendo al 30% di ossigenazione e cedendo 560.000.000 molecole di O₂ come in condizioni normali.

In questo modo l'azione data dall'incremento di concentrazione del DPG, compensa l'incompleta ossigenazione dell'Hb.

Questa compensazione ha un costo fisiologico, la stessa riduzione di affinità operata dal DPG non può essere utilizzata dall'azione degli H⁺ (effetto Bohr). L'effetto Bohr sussisterà ugualmente, ma opererà in una gamma di affinità più piccola, perchè la gamma fisiologica dell'Hb è stata in parte utilizzata dall'incremento di concentrazione di DPG.

Senza l'altro effetto di compensazione, che si attua in stati di ipossia prolungati (incremento del numero dei globuli rossi, vedere dopo) non si potranno più avere gli stessi alti ritmi ossidativi massimi perchè i protoni liberati troveranno meno complessi Hb-O₂ su cui agire. Gli effetti del DPG e del H⁺ si sommano, uno riduce l'estensione dell'altro perchè sia + che DPG, favoriscono la conversione della Hb-ossi nella forma deossi (fig.6-8a). Quindi l'incremento della concentrazione di DPG riduce il numero di molecole Hb-ossi, e poichè la concentrazione del DPG non fluttua nei globuli rossi durante la circolazione, mentre i protoni, intervenendo successivamente all'ossigenazione dell'Hb, vengono limitati nella loro massima azione. Infatti, l'incremento di [DPG] fa aumentare l'effetto Bohr, nel senso che si ha un effetto cooperativo maggiore e la curva sigmoide si sposta a destra più di quello che avverrebbe in presenza di una minore [DPG]. L'incremento di DPG, esaltando l'effetto Bohr, rende l'Hb più sensibile all'azione dei protoni, tuttavia la quantità massima di O₂ che può essere liberata per l'effetto Bohr, risulta ridotta in conseguenza del fatto che l'Hb che giunge ai tessuti è meno ossigenata.

Sebbene l'Hb-deossi contenga una molecola di DPG e 4 H⁺, e per passare dalla forma ossi alla forma deossi dell'Hb sia richiesta l'associazione di DPG e di H⁺, è sufficiente variare la concentrazione dell'uno o dell'altro per spostare l'equilibrio di conformazione. Incrementando la concentrazione del DPG per effetto allosterico, un certo numero di molecole Hb-ossi passa nella forma deossi, e gli H⁺ richiesti sono presi dal mezzo ([H⁺]≈100nM), senza che sia necessario un loro

incremento di concentrazione Se contemporaneamente all'incremento di DPG, c'è anche un incremento di $[H^+]$, il numero di molecole di Hb-ossi che passa nella forma deossi, è maggiore. Analogo ragionamento si può fare per $l'H_+$.

In individui sani, in condizioni di basse pO_2 alveolari, subentra un altro tipo di compensazione: l'incremento del numero dei globuli rossi. Questa compensazione (adattamento alle alte quote) richiede tempi più lunghi (20-40 giorni) di quelli richiesti per incrementare al massimo la concentrazione del DPG (2 giorni).

L'incremento del numero dei globuli rossi non è altro che un incremento del numero delle molecole di Hb che tende a compensare la perdita delle molecole di Hb che, a causa della bassa pO_2 e del conseguente incremento della Css -DPG, non si sono ossigenate a livello dei polmoni. Con l'incremento del numero dei globuli rossi e quindi di molecole di Hb, il trasporto di O_2 ricupera anche la sua potenzialità di regolazione in risposta a variazioni di H^+ .

L'adattamento alle alte quote è utilizzato dagli sportivi per dotarsi di maggiore potenzialità di metabolismo aerobico. Infatti, dopo un periodo di alta montagna, gli atleti avranno aumentato la Css -DPG ed il numero dei loro globuli rossi per le ragioni sopra esposte. Quando gli atleti tornano a quote più basse con pO_2 vicine a 120 mm di Hg, la Css -DPG si abbasserà in tempi relativamente brevi (pochi giorni), mentre il numero di globuli rossi e quindi di molecole di Hb, rimarrà superiore alla norma per tempi più lunghi (la vita media di un globulo rosso umano è circa due mesi). Dopo il periodo di adattamento, tale eccedenza di molecole di Hb renderà l'atleta più dotato di capacità di trasporto ematico di O_2 e di capacità di risposta all'incremento di concentrazione di H^+ . L'atleta è perciò potenzialmente più adatto agli sforzi muscolari aerobici, cioè agli sforzi muscolari prolungati (es. corsa di lunga distanza).

Le vittorie nelle corse di 5000 ed oltre metri degli atleti originari degli altipiani del Kenya, vengono attribuite alle loro maggiori capacità di trasporto di ossigeno dovuto al loro adattamento (genetico ed ambientale) alle alte quote. Tuttavia una opportuna preparazione ed alimentazione, possono portare stessi ottimi risultati (vedere le vittorie dei maratoneti italiani associate all'alta qualità dei medici ed allenatori sportivi italiani). Ugualmente viene spiegata l'alta resistenza alle alte quote dei montanari nepalesi (Sherpa), delle popolazioni andine, come i Boliviani che vivono oltre i 5000 metri di altitudine ed hanno una Css -DPG di circa il 20% più alta e più globuli rossi delle popolazioni che vivono a livello del mare.

Nel suo libro sulla conquista dell'impero Inca, Pizzarro racconta che, quando con il suo piccolo esercito raggiunse l'altipiano andino, tutti si sentirono male e furono colti da spossatezza, tanto che se fossero stati attaccati in quel momento sarebbero stati facilmente

sopraffatti dagli Incas. Invece i conquistatori spagnoli poterono acclimatarsi circa una settimana e riprendere le forze prima che gli Incas decidessero di attaccarli. Gli spagnoli riuscirono a vincere questa prima battaglia e così le altre che seguirono.

Si ritiene che Pizarro e i suoi, giunti sull'altipiano andino, soffrissero di ipossia per la basse pO_2 che causò loro malessere. Dopo pochi giorni il DPG deve essere aumentato in concentrazione nei globuli rossi dei conquistatori spagnoli, permettendo un buon trasporto di O_2 e restituendo agli stessi le forze per combattere. Se Pizarro ed i suoi uomini non avessero posseduto una buona regolazione da DPG della affinità dell'Hb per l' O_2 , la loro storia, quella dell'impero Inca, e forse anche quella del mondo, sarebbero state diverse.

La presenza di un meccanismo di regolazione da DPG in uomini che hanno sempre vissuto a livello del mare, appare sorprendente. Tuttavia, la regolazione da DPG è presente anche per compensare sforzi muscolari aerobici, respirazione in ambienti poco ossigenati, per cui il meccanismo deve aver favorito la selezione positiva degli individui che la possiedono, anche se viventi a livello del mare.

Sommario.

La riduzione dell'affinità dell'Hb verso l' O_2 per azione del DPG, ha almeno tre funzioni: a) compensare l'incompleta ossigenazione dell'Hb a livello dei polmoni con un maggior rilascio di O_2 a livello dei tessuti. L'incompleta ossigenazione può derivare da cause esterne (ridotta pO_2) o interne (ridotta permeabilità all' O_2 del tessuto polmonare). b) favorire un maggior rilascio di O_2 a livello dei tessuti quando la richiesta di O_2 da parte dell'organismo è aumentata per alcune ore (come nello sforzo muscolare prolungato di una maratona). c) favorire un maggior rilascio di O_2 a livello dei tessuti quando la gittata cardiaca è insufficiente per le esigenze di O_2 dell'organismo.

Funzione fisiologica della riduzione dell'affinità dell'Hb verso l' O_2 per azione della CO_2 .

La CO_2 può legarsi covalentemente ai gruppi aminici terminali delle subunità α e β dell'emoglobina ossigenata, formando carbamino derivati. I carbamino derivati delle subunità α (non delle β) formano legami salini con l'Arg 141 dell'altra subunità α direttamente (senza H^+ di Bohr e Cl^-), favorendo la conversione della Hb-ossi nella conformazione deossi, e quindi la liberazione dell' O_2 da parte dell'Hb (figg. 6-8c, 6-13e,f, 6-14g,h). Inoltre la carbamilazione delle subunità α e β porta alla liberazione di protoni che favoriscono anch'essi la dissociazione delle HbO_2 (fig. 6-5).

La carbamilazione delle subunità β ha un effetto negativo sulla associazione dell'acido DPG, per cui l'effetto della associazione della CO_2 da parte delle subunità β sulla affinità per l' O_2 dell'Hb, può essere non rilevante.

Tuttavia, l'azione complessiva del legame della CO_2 ai gruppi aminoterminali delle subunità α e β , risulta in una riduzione dell'affinità dell'Hb verso l' O_2 .

La funzione fisiologica della associazione diretta della CO_2 all'Hb, è la stessa di quella degli H^+ , favorire il rilascio di O_2 nelle Hb parzialmente ossigenate e nei tessuti più metabolicamente attivi; con la differenza che la CO_2 è segnale specifico dei tessuti attivi aerobicamente, mentre l' H^+ può derivare dalla CO_2 e dall'acido lattico (prodotto della glicolisi anaerobia), e quindi è segnale più generico.

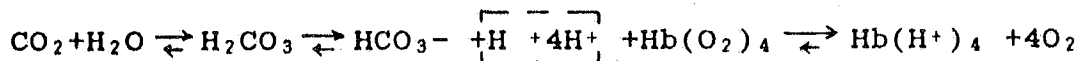
Ione cloro.

Lo ione cloro (Cl^-) stabilizza la conformazione deossi della Hb, per cui è un effetto negativo. La funzione di questa azione, e cioè della riduzione dell'affinità dell'Hb verso l' O_2 , è tuttora discussa e non verrà qui trattata.

L'Hb è la proteina di trasporto della CO_2 .

L'Hb può trasportare la CO_2 mediante il legame covalente di 4 molecole di CO_2 ai gruppi amino-terminali delle subunità α e β di una molecola di Hb (carboamino derivati) (fig.6-13-14). In questo modo è trasportato dai tessuti ai polmoni circa il 20% della CO_2 (tab. 6-1). Inoltre l'Hb favorisce il trasporto di CO_2 , associando a livello dei tessuti quattro protoni, favorendo così la dissociazione dell'acido carbonico e quindi la conversione di CO_2 in acido, ed a livello dei polmoni liberando protoni e favorendo così la riformazione della CO_2 .

→
(tessuti)

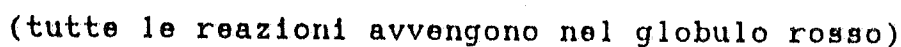


Tutte le reazioni avvengono nel globulo rosso che contiene Hb e l'anidrasi carbonica.

L'assunzione di H^+ da parte dell'Hb, favorisce lo spostamento verso destra di tutta la serie di reazioni, e quindi permette la conversione di un numero maggiore di molecole di CO_2 in ione bicarbonato (HCO_3^-).

Delle tre forme chimiche (CO_2 , H_2CO_3 , HCO_3^-) in cui è trasportata la CO_2 nel sangue, l' HCO_3^- è la più solubile. Circa il 70% della CO_2 viene trasportata come ione

A livello dei polmoni la serie degli equilibri è spostata verso sinistra per azione della alta pO_2 presente nel sangue dei polmoni ed anche perchè la CO_2 ha la possibilità di essere eliminata come gas dai polmoni stessi.



Nei polmoni l'Hb ossigenandosi libera i protoni assunti a livello dei tessuti, favorendo la riformazione di CO_2 e quindi la sua eliminazione con l'aria espirata, ultima fase del trasporto di CO_2 .

Il trasporto dell'O₂ e quello della CO₂ sono integrati.

Questa integrazione risulta dalla capacità dell'emoglobina di rispondere ai cambiamenti dell'ambiente (soluzione) in cui si trova. In particolare, cambiamenti di pO_2 , pH e pCO_2 . La produzione di CO_2 da parte dei tessuti favorisce il rilascio di O_2 da parte dell'Hb e nello stesso tempo favorisce l'assunzione, da parte dell'Hb, di CO_2 ed H^+ . L'alta pO_2 dei polmoni determina l'ossigenazione dell'Hb e nello stesso tempo la liberazione di H^+ e CO_2 . Questa è una caratteristica molto diffusa nella regolazione dei sistemi biologici: il componente cellulare, in questo caso la molecola trasportata (CO_2 e O_2), è intermedio metabolico (fa parte di una via metabolica) ed è anche regolatore del proprio metabolismo (in questo caso del proprio trasporto).

Sommario.

a) Variazione dell'attività di sintesi del ATP dei tessuti. Gli effettori sono la CO_2 prodotta dal metabolismo aerobico e l' H^+ , che è prodotto dalle cellule in conseguenza della maggiore produzione di CO_2 e/o di acido lattico prodotto nel metabolismo anaerobico. Questo adattamento è veloce e dipende solo dal tempo richiesto per la diffusione dell' H^+ e

CO₂ nel globulo rosso. L'azione di questi due effettori sull'Hb è continua solo se i tessuti continuano a produrli perchè CO₂ e H⁺ sono eliminati dal sangue a livello dei polmoni ad ogni atto respiratorio.

b) Riduzione della pO₂ a causa di incrementi della richiesta di O₂, notevoli e protratti nel tempo per una o più ore, per sostenere il metabolismo aerobico del tessuto muscolare in contrazione; la riduzione della pO₂ può essere anche causata da una gittata cardiaca insufficiente a sostenere le esigenze dell'organismo. L'effettore è il DPG che aumenta in C_{ss} nel globulo rosso

c) Variazione fisiologica e patologica della pO₂ alveolare. L'effettore è il DPG che aumenta in C_{ss} nel globulo rosso quando la pO₂ alveolare è minore dei valori normali (ad esempio quella della pO₂ in alta montagna).

Questo meccanismo di regolazione richiede circa due giorni per compensare una forte caduta di pO₂ e circa due giorni per ritornare a valori normali, quando la pO₂ scende ai valori del livello del mare.

I meccanismi indicati in b, c, sono definiti adattamento, cioè una regolazione che richiede tempi lunghi per essere attuata.

Tutti i meccanismi di regolazione sopra indicati (a, b, c,) al fine di incrementare il rilascio di O₂ a livello dei tessuti agiscono riducendo l'affinità del Hb per l'O₂.

Anche la quantità totale dell'Hb (numero dei globuli rossi) è regolata in relazione alla pO₂ alveolare.

Questo meccanismo di regolazione è ancora più lento (vari giorni) di quello del DPG, ed è anch'esso definito adattamento.

Meccanismo molecolare di ossigenazione dell'emoglobina.

L'emoglobina è una proteina oligomerica (tetramero costituito da due subunità identiche α e due subunità identiche β (fig. 6-3), capace di due tipi di cambiamenti conformazionali (fig. 6-8):

- ciascuna delle due subunità può cambiare conformazione indipendentemente e senza dissociarsi dalle altre subunità (figg. 6-8, 6-14). Il cambiamento di conformazione della subunità è anche detto della "struttura terziaria" della subunità.;

- le subunità possono spostarsi l'una rispetto all'altra senza dissociarsi fra loro. Questo cambiamento di conformazione è anche detto della "struttura quaternaria" dell'oligomero (figg. 6-8+6-10).

Le subunità α e β hanno una conformazione stabile detta deossi o T. Con l'ossigenazione le subunità hanno un cambiamento di struttura terziaria, e questa nuova conformazione è detta T*, da questa conformazione le subunità passano nella conformazione R quando il tetramero passa dalla conformazione T (detta deossi) a quella R (detta ossi) (fig. 6-8).

La molecola di Hb ha una struttura quaternaria deossi o T (Tense), ed una struttura quaternaria ossi o R (Relaxed) (fig. 6-8).

Le due conformazioni sono caratterizzate da due diverse e

specifiche posizioni relative dei dimeri

$\alpha_1\beta_1$ ed $\alpha_1\beta_2$ (figg. 6-9 e 6-10).

Il termine ossi o deossi per la struttura quaternaria indica lo stato della conformazione che è rispettivamente presente nella Hb completamente ossigenata e non-ossigenata sulle 4 subunità.

Tuttavia la Hb parzialmente ossigenata può assumere reversibilmente una delle due conformazioni (ossi o deossi). E' infatti il cambiamento di conformazione quaternaria che determina il cambiamento di affinità dell'Hb verso l'O₂. Il termine ossi indica la conformazione quaternaria dell'Hb che è più affine all'O₂, e deossi quella meno affine.

L'emoglobina cambia conformazione terziaria e quaternaria in relazione al suo stato di ossigenazione e compie questi cambiamenti come un congegno meccanico.

Le leve di questo congegno molecolare hanno le dimensioni minime degli atomi uniti da legami covalenti con le relative possibilità di rotazione nello spazio; le leve maggiori sono costituite dai tratti in α elica.

La struttura terziaria delle subunità delle Hb è costituita da tratti di peptide in α elica (fig.6-3ab) (8 nelle subunità α e 9 nelle subunità β) unite da parti strutturalmente più semplici che permettono il ripiegamento ed anche gli spostamenti di un tratto di α elica rispetto ad un altro ad esso vicino (cambiamenti di struttura terziaria).

Questo congegno, a differenza di quelli meccanici, non ha bisogno di una cassa, cioè di una scatola in cui sono contenute le parti mobili e fisse del congegno, tenute in sede da viti, perni e molle, perchè la struttura delle singole subunità è mantenuta da legami deboli che si instaurano tra i residui aminoacidici che costituiscono il polipeptide stesso.

Altri legami deboli tengono unite le subunità α e β tra loro, ed alcuni dei legami deboli intracatena ed intercatena devono essere spezzati per permettere i cambiamenti di struttura terziaria e quaternaria. I residui aminoacidici ed i relativi legami non sono indicati in fig. 6-3a,b, al fine di mostrare parti in α elica. La struttura completa è in fig. 6-3c.

Le strutture terziarie delle subunità α e β sono molto simili tra loro. La subunità α manca del tratto D di α elica che è presente nelle subunità β .

Di questo tratto D presente nelle subunità β non si conosce la specifica funzione. Altre differenze strutturali delle subunità α e β che caratterizzano differenze funzionali e di regolazione delle subunità sono descritte successivamente.

Assumiamo che l'Hb sia in una soluzione in assenza di ossigeno, le sue molecole si troveranno nella conformazione deossi (T). Questa struttura è stabilizzata da legami a H-salini tra i residui aminoacidici delle due subunità α , tra quelli delle α e quelli delle β , e tra i residui aminoacidici di ambedue le subunità β con l'acido 2,3difosfoglicerico (DPG) (vedere figg. 6-12). L'insieme di questi legami è definito costrizione quaternaria, nel senso che i legami salini stabilizzano l'Hb in quella conformazione quaternaria T. Altri legami deboli sono costantemente presenti mantenendo le 4 subunità unite tra loro

sia nella forma T che in quella R.

Quando le due subunità α si ossigenano e cambiano conformazione, i legami deboli che stabilizzano la struttura quaternaria-deossi (T), si spezzano rendendo energeticamente possibile alla T. di 37°C il cambiamento della struttura quaternaria da deossi ad ossi, anche se le due subunità β non sono ancora ossigenate. Con la rottura dei legami deboli tra le subunità α si ha liberazione di due protoni di Bohr (fig. 6-8, 6-13, 6-14). Il cambiamento di struttura quaternaria causa il rilascio di DPG (vedere figg. 6-8, 6-14). L'ossigenazione delle subunità β ed il conseguente cambiamento di conformazione, causa la rottura di legami salini intra-subunità ed in rilascio di altri due protoni di Bohr, uno per ogni subunità.

Quando l'Hb si trova nella conformazione deossi (T) (figg. 6-8, 6-13, 6-14) ha (relativamente alla forma R) scarsa affinità per l'O₂, mentre nella conformazione ossi (R) ha alta affinità per l'O₂.

In assenza di O₂, è improbabile che l'Hb cambi spontaneamente conformazione da deossi ad ossi, mentre è indotta a farlo dall'ossigenazione di almeno due subunità α quando è ancora nella conformazione quaternaria T.

Quando la prima molecola di O₂ si lega alla Hb nella conformazione T si crea una certa tensione nel tetramero Hb, la tensione aumenta con l'associazione della seconda molecola di O₂. La tensione creata con l'ossigenazione delle subunità α , è rimossa con la transizione della Hb dallo stato T a quello R, cioè con il cambiamento della struttura quaternaria.

Le subunità che si ossigenano per prime sono le subunità α . Ciò è indicato da esperimenti di associazione dell'O₂ con Hb e dalla presenza nelle subunità β di un residuo di valina (Val E11, β 67) (fig. 6-18) che è posto in modo da ostacolare il passaggio dell'O₂ verso il Fe (atomo che lega l'O₂). Il Fe è posto all'interno della molecola proteica, e l'O₂ raggiunge il Fe attraverso una piccola cavità che nelle subunità β è parzialmente ostruita dalla Val E11. Si assume che il residuo di valina riduca la frequenza degli incontri dell'O₂ con il ferro, e quindi renda meno probabile l'ossigenazione delle subunità β .

Il residuo di valina causa una riduzione di affinità all'O₂ per riduzione della costante cinetica di associazione. Nelle subunità α il residuo di valina (Val E11, α 62) è posto in maniera leggermente diversa e non ostacola il passaggio dell'O₂ verso il Fe, e quindi l'ossigenazione delle subunità α è più probabile rispetto a quella delle subunità β agli stessi valori di pO₂. La posizione del residuo di valina è una delle differenze strutturali esistenti tra le subunità α e β che sono responsabili di differenze funzionali delle due subunità.

Quando l'atomo di ferro-eme di una subunità associa una molecola di O₂, passa da un stato di coordinazione 5 (5 legami) con elettroni disaccoppiati (condizione detta di "high spin"), ad uno stato di coordinazione 6 (6 legami) con una variazione della distribuzione degli elettroni (low spin).

L'eme è inserito stabilmente nelle subunità α e β in una tasca idrofobica, ed è disposto quasi perpendicolarmente

alla parte di superficie aperta della tasca stessa (fig. 6-3). L'eme è come affogato nella tasca idrofobica, tuttavia esistono delle piccole cavità tra eme e residui delle subunità. Una di esse è un canale posto dalla parte dell'istidina distale (E7) (vedere fig. 6-18) che permette l'accesso dell'O₂ sul ferro-eme (su questo canale si affaccia la Val E11 nelle subunità β). Le altre cavità hanno la funzione di permettere gli spostamenti che l'eme e le parti del polipeptide ad esso vicine compiono quando avvengono l'ossigenazione e la deossigenazione delle subunità. Il ferro legato all'eme è disposto al vertice di una piramide (molto schiacciata) a base quadrata, ai vertici di questa base sono costituiti degli N dell'eme (figg. 6-15+6-18). Il ferro si trova circa 0,6 Å fuori del piano dell'eme. Il ferro è legato all'istidina F8 (His α 87, His β 92) con il 5° legame di coordinazione, questo legame forma un angolo di 7°-8° con il piano dell'eme (base della piramide).

Con l'associazione dell'ossigeno molecolare al ferro, si ha la formazione del 6° legame di coordinazione, il ferro riduce il suo diametro e tende ad avvicinarsi al piano dell'eme, la piramide diviene ancora più schiacciata (è quasi annullata), l'istidina F8 (α 87, β 92) segue nel movimento il ferro verso il piano dell'eme, ed inoltre il legame ferro-istidina diviene quasi perpendicolare al piano dell'eme (fig. 6-15). Questo movimento non si completa perchè non è completamente libero. Anche se il ferro riduce il suo diametro, lo spostamento verso il piano dell'eme è impedito stericamente in vari punti dai residui aminoacidici delle eliche F e G. L'impedimento allo spostamento del ferro è operato sull'istidina F8 legata al ferro stesso.

L'istidina F8 non può avvicinarsi all'eme perchè un suo atomo di H (Σ) (quello dalla parte in cui l'istidina è inclinata verso l'eme, fig. 6-15) è già in contatto con l'eme, e l'istidina non può cambiare inclinazione (al fine di spostare l'idrogeno suddetto) perchè è legata alla catena F e perchè l'istidina F 8 è circondata da residui aminoacidici della stessa elica F, dell'elica FG ed H (figg. 6-16+6-18). In particolare, la valina FG5 (Val α 93, Val β 98) ha un ruolo importante perchè è sufficiente un suo scorrimento su un piano parallelo al piano dell'eme, perchè porti il residuo di valina a non interagire più con il residuo vinilico dell'eme, affinchè sia rimosso l'impedimento all'avvicinamento dell' His-F6-Ferro verso il piano dell'eme.

Ciò si realizza con uno spostamento della catena F e dell'eme, che risulta in uno spostamento relativo tra la catena F e l'eme (fig. 6-17). Questo spostamento interessa anche le catene E e G ma è molto più ridotto. I cambiamenti conformazionali delle subunità α e β sono simili, ma nelle β c'è uno spostamento maggiore dell'eme rispetto alla Val E11 (β 67). Il residuo di Val E11 è proprio quello che impedisce l'accesso dell'ossigeno al ferro quando le subunità β sono nella conformazione deossi.

Quindi lo spostamento dell'istidina-ferro verso l'eme, è realizzato con un cambiamento conformazionale (cambiamento di struttura terziaria) della subunità stessa, sia α che β . Tuttavia questo cambiamento di struttura rimane incompleto

se l'Hb si trova nella conformazione T.

Se l'Hb è nella conformazione T, con l'ossigenazione la subunità (sia α che β) assume la conformazione t^* (vedere figg. 6-8, 6-15b, 6-17) che è una conformazione dotata di una certa stabilità, tuttavia meno stabile della conformazione terziaria r, se la subunità r è ossigenata e fa parte di una molecola di Hb con struttura quaternaria R, e meno stabile della conformazione terziaria t, se la subunità t è deossigenata e fa parte di una molecola di Hb con struttura quaternaria T. Per questo si parla di un cambiamento di struttura terziaria "incompleto" se la subunità α o β si ossigena quando l'Hb è nella conformazione T.

Il cambiamento di conformazione delle subunità è indotto dall' O_2 , che associandosi al ferro causa la riduzione del raggio atomico del ferro e quindi una tensione nella subunità (soprattutto nella elica F) che è costretta ad assumere una conformazione intermedia (t^*) al fine di distribuire l'energia liberata dalla formazione del legame tra O_2 e ferro. L'energia è distribuita in parte tra eme ed O_2 (il loro legame risulta più debole perchè in definitiva non viene rilasciata tutta l'energia di legame), ed in parte tra eme e istidina e tra tutti i legami dei residui aminoacidici che si oppongono al completo cambiamento di conformazione, che porterebbe la subunità ad assumere la conformazione r. Questo cambiamento di conformazione permetterebbe un legame più stabile tra O_2 e ferro (incrementa l'affinità tra Hb ed O_2).

La conformazione dell'Hb deossigenata è indicata con T (tense), tuttavia l'Hb in assenza di O_2 non ha tensione interna, quindi il termine tense è improprio. La tensione è presente nell'Hb solo quando l' O_2 si associa al ferro e le subunità sono nella conformazione t^* perchè la Hb è ancora nella conformazione T. La tensione è generata dalla tendenza del ferro, nello stato di coordinazione 5° , a formare il 6° legame di coordinazione, e dalla subunità a mantenere la sua conformazione stabilizzata da legami deboli intra ed intermolecolari. I due stati sono in contrapposizione tra loro: la reazione di associazione tra ferro ed O_2 tende a formare complessi Fe- O_2 (cioè il 6° legame di coordinazione nel ferro-eme), mentre la subunità, che è dotata di stabilità, viene indotta a lasciare tale conformazione. La stabilità della conformazione della subunità viene alterata dall'associazione dell' O_2 al ferro ed i legami deboli che stabilizzano questa conformazione tendono ad opporsi al legame tra ferro ed O_2 .

Il ferro entra continuamente in contatto con molecole di O_2 , quindi la velocità di formazione del complesso Fe- O_2 è alta (la costante cinetica della reazione di associazione, $k_1 \approx 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), ma è anche molto alta la velocità della sua dissociazione (la costante cinetica della reazione di dissociazione, $k_2 \approx 10^3 \text{ s}^{-1}$) a causa dell'opposizione all'ossigenazione data dalla parte proteica della molecola. Questa opposizione risulta in una ridotta affinità del ferro verso l' O_2 ($K_a \approx 2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$). Si parla di ridotta affinità perchè se l'istidina F8 fosse libera di spostarsi quando il

ferro forma il 6° legame di coordinazione, l'affinità del ferro per l'O₂ sarebbe molto più alta, come avviene per la Mb che ha la $K_a = 10^6 \text{ M}^{-1}$.

Nell'Hb-R parzialmente ossigenata e/o priva di DPG, l'affinità per l'O₂ delle subunità non ancora ossigenate è molto alta ($K_a \approx 4 \cdot 10^6$) con un incremento del valore della K_a di circa 200 volte rispetto alla prima subunità che si ossigena. L'incremento è dovuto soprattutto ad una riduzione della costante di dissociazione $k_2 \approx 10 \text{ S}^{-1}$, mentre la costante di associazione $k_1 \approx 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ si assume uguale alla k_1 di associazione della prima molecola di O₂. Nel Hb-R, il residuo di Val $\beta 67$ (E11) non impedisce il passaggio dell'O₂ verso il Fe-eme delle subunità β (perchè più libere di oscillare da t a t^*), per cui si assume che il valore della costante cinetica di associazione sia circa uguale a quello delle subunità α nell'Hb-T.

In genere la reattività degli atomi è influenzata da altri atomi o gruppi di atomi vicini che influenzano lo stato dei loro elettroni, rendendoli più o meno affini ad atomi di altre molecole. La reattività di un atomo può essere ridotta perchè l'atomo è parzialmente coperto da un gruppo atomico che ne impedisce l'incontro con molecole in soluzione (es. la Val E11 che scherma il Fe eminico delle subunità β nell'Hb-T).

Nel caso sopra esposto: "ferro-eminico delle subunità α ", il ferro è nella disposizione elettronica reattiva per l'O₂, non è "schermato" da gruppi atomici. Tuttavia la sua reattività è limitata dall'impossibilità di eseguire completamente il movimento verso il piano dell'eme, perchè parte dell'energia liberata nella formazione del 6° legame di coordinazione, è spesa per realizzare questo movimento. Quindi l'associazione dell'O₂ al ferro-eminico produce l'energia chimica capace di far muovere il congegno molecolare costituito dal tetramero Hb. Le proteine sono molecole capaci di utilizzare l'energia dei legami chimici per compiere movimenti.

La stabilità della conformazione deossi suggerisce che nessuna molecola di Hb dovrebbe legare O₂ a bassa pO₂, oppure che se ciò è possibile per alcune, dovrebbe esserlo per tutte. Tuttavia, in una soluzione le molecole di Hb non sono tutte allo stesso livello energetico, per cui alcune (percentualmente poche) molecole di Hb, in conseguenza dell'agitazione termica di tutte le molecole della soluzione, hanno una subunità α nella conformazione ossi, senza aver ancora associato l'O₂; per la stessa ragione (calore) altre molecole di Hb possono avere subunità α con la conformazione deossi indebolita, per cui l'O₂ che si associa al ferro, trova una minore resistenza, ed è richiesta meno energia per far cambiare conformazione alla subunità. Anche l'energia cinetica che l'O₂ scarica sul ferro e quindi sulle subunità, contribuisce ad indebolire i legami che stabilizzano la conformazione deossi della subunità α , perchè sebbene la subunità sia stabile nella sua conformazione deossi (t), è costruita per cambiare conformazione ed assumere quella ossi (r), sempre che sia fornita energia nella giusta quantità.

Come negli orologi che si caricano meccanicamente, i movimenti casuali ed in tutte le direzioni fatti dal polso a cui è allacciato l'orologio, spostano la parte mobile che ricarica la molla dell'orologio. Il movimento del polso deve essere sufficientemente veloce da mettere in moto la parte mobile, cioè deve conferirgli sufficiente energia da comprimere la molla. Non tutti i movimenti del polso per velocità e/o direzione risultano in una ricarica dell'orologio, ma solo quelli che portano ad uno spostamento della parte mobile, movimento che è obbligato da altre parti dell'orologio e che è l'unico che può ricaricare la molla. Statisticamente risulta che, a basse pO_2 , poche molecole di Hb associano l' O_2 perchè all'alta velocità di formazione del complesso, è opposta una alta velocità di dissociazione. Data la reversibilità della reazione, le molecole Hb ossigenate non sono mai le stesse.

Evoluzione dell'ossigenazione dell'Hb: dallo stato di tensione causato dall'associazione dell' O_2 , al cambiamento di conformazione terziaria delle subunità .

L'associazione dell' O_2 al ferro-eme e il conseguente spostamento dell'elica F, causa la rottura di almeno 5 legami deboli (a idrogeno e salini) quando si ossigenano le subunità α , e di 3 legami deboli (a idrogeno e salini) quando si ossigenano le subunità β . Questi legami sono costituiti dai residui carbossi-terminali (Arg α 141, Tyr α 140, His β 146, Tyr β 145) ed anche dai gruppi carbossilici terminali stessi (vedere figg. 6-13, 6-14). I legami che si rompono con l'ossigenazione delle subunità α , sono costituiti da residui della stessa subunità (2 legami intrasubunità), da residui di questa subunità con l'altra subunità α , che può essere non o già ossigenata (3 legami intersubunità), e con quella della subunità β che è in contatto con la parte carbossi-terminale della subunità α che si ossigena (1 legame intersubunità).

I legami che si rompono con l'ossigenazione delle subunità β sono 2 intrasubunità ed 1 intersubunità con la subunità α che è in contatto con la parte carbossiterminale della subunità β (vedere figg. 6-13, 6-14). Questo ultimo legame si assume che non sia presente quando l'Hb è nella conformazione R (fig. 6-14c, d).

Qui di seguito verranno indicati i cambiamenti conformazionali che con l'ossigenazione avvengono nelle subunità α e β . I cambiamenti simili sono descritti insieme e, tra parentesi, sono indicati i residui amino acidici delle subunità α e β . Questi residui sono di aminoacidi identici, ma occupano posti leggermente diversi nelle rispettive sequenze α e β .

Lo spostamento che subisce la catena F con l'associazione dell' O_2 al Fe-eme, ha come prima conseguenza l'indebolimento del legame tra la Tyr HC2 (Tyr α 140, Tyr β 145) che interagisce tramite il gruppo OH del suo residuo proprio con il gruppo carbossilico della Val FG5 della subunità stessa che si ossigena (Val FG5 è: Val α 93, Val β 98) (fig. 6-17).

Come indicato precedentemente, la Val FG5 viene spostata proprio con lo spostamento che subisce la catena F in conseguenza della ossigenazione. L'indebolimento e poi la rottura del legame tra la Tyr HC2 (α 140, β 145) e la Val FG5 (figg. 6-13, 6-14, 6-17), ha come conseguenza la rottura dei legami a idrogeno e salini al terminale carbossilico delle subunità α e β , quando rispettivamente si ossigenano. Si ha così la liberazione di 1 protone (protone di Bohr) ed 1 ione Cl^- per ogni subunità α , ed 1 protone (protone di Bohr) per ogni subunità β che si ossigena. Tutti gli spostamenti descritti rappresentano il cambiamento di conformazione a cui vanno incontro le subunità α e β (nel caso venissero ossigenate in una molecola Hb in conformazione T) in conseguenza dell'ossigenazione. Anche in questa nuova conformazione, indicata con t^* , le subunità α (e β nel caso venissero ossigenate in una molecola di Hb in conformazione T) mantengono la scarsa affinità che avevano per l' O_2 perchè non sono sufficientemente libere di completare il cambiamento di struttura terziaria ed assumere la conformazione r. Questo completamento si può realizzare solo quando si ha il cambiamento di conformazione quaternaria da T (deossi) ad R (ossi), che conferisce maggiore libertà di movimento e quindi maggiore affinità per l' O_2 alle subunità α e β , sia che esse siano ossigenate o no.

Nelle subunità β_1 , l'impedimento al cambiamento di conformazione direttamente da t ad r , è causato dalle interazioni dei ripiegamenti FG β_1 con l'elica C α_2 e FG β_2 con l'elica C α_1 (fig. 6-11a). Anche le subunità α hanno impedimenti a cambiare conformazione a causa dei contatti senza legami (impedimenti sterici) tra αFG e βC ($\alpha_1-\beta_2$ ed $\alpha_2-\beta_1$).

Questi impedimenti saranno discussi nel paragrafo successivo.

I ripiegamenti FG delle subunità β e l'elica C delle subunità α , hanno tra loro almeno un punto di contatto, senza formare legami, tra His β 145 ed un residuo dell'elica α C, inoltre formano tra loro due legami a idrogeno. Punto di contatto e legami a H sono rimossi quando l'Hb passa dalla conformazione quaternaria T a quella R (fig. 6-11b). Si può ammettere che il cambiamento di conformazione dell'Hb da T ad R possa avvenire anche in molecole di Hb non ossigenate sulle quattro subunità (fig. 6-8a), tuttavia questo è un evento improbabile data la presenza dei legami secondari intersubunità.

Abbiamo visto che l'ossigenazione di una subunità crea una tensione nella molecola di Hb, la tensione aumenta con l'ossigenazione della seconda subunità e così via. La tensione si crea perchè la subunità ossigenata tende ad assumere la conformazione terziaria r che è più stabile per una subunità α o β ossigenata, mentre la conformazione quaternaria T si oppone a questo cambiamento, ed il passaggio dalla conformazione quaternaria da T ad R rimuove la tensione presente nel tetramero Hb.

Si assume che nelle condizioni cellulari il cambiamento di struttura quaternaria avvenga in media dopo che si sono

ossigenate 2 o 3 subunità.

La presenza della Val β 67 (E11) (fig. 6-18) e dati sperimentali, suggeriscono che l'ossigenazione dell'Hb inizi con le subunità α . Quando le due subunità sono ossigenate, Hb (tetramero) ha perso vari legami quaternari ed inoltre è in stato di tensione, quindi può essere indotto ad assumere la conformazione R. In questa conformazione le subunità α già ossigenate, assumeranno la conformazione r divenendo più affini all' O_2 associato in precedenza. Le subunità β non ancora ossigenate, presenti in una molecola di Hb nella conformazione R, sebbene siano ancora nella conformazione t, sono molto affini all' O_2 . Ciò è determinato dal fatto che le subunità β hanno ora libertà di cambiare conformazione e quindi non hanno impedimenti quaternari (legami ed impedimenti sterici causati dalle altre subunità) ad assumere direttamente la conformazione r. Quindi non è tanto la necessità del cambiamento di conformazione terziaria che rende le subunità α e β meno affini all' O_2 , ma la maggiore o minore libertà a compiere questo cambiamento. Ciò è suggerito da esperimenti indicanti che l'Hb, spogliata di DPG (stripped Hb) ed in assenza di O_2 , è nella conformazione R, mentre le subunità α e β sono nella conformazione t. Ciò nonostante l'Hb ha un'alta affinità per l' O_2 indicata dalla curva di ossigenazione iperbolica (fig. 6-6b).

Nella Hb deossigenata (conformazione T) le subunità α sono più esposte delle subunità β all'ossigenazione (vedi sopra), ed il loro cambiamento di struttura terziaria (da t a t*), richiede la rottura di almeno 5 legami deboli. Se assumiamo che l'Hb rimanga nella conformazione T, l'ossigenazione delle subunità β richiede la rottura di 3 legami deboli, quindi anche in queste condizioni (Hb-T) le subunità β sono più affini all' O_2 delle subunità α . Quindi si può ammettere una cooperatività positiva anche senza che l'Hb passi da T ad R (fig. 6-8a). La transizione dell'Hb da T ad R, amplifica l'effetto cooperativo. L'Hb è costruita in modo che i due effetti cooperativi cooperino tra loro: le subunità α si ossigenano per prime, l'Hb passa da T ad R e le subunità β , che sono stabilizzate da un minor numero di legami deboli, non più impedita da legami quaternari, divengono anche più libere e possono cambiare conformazione direttamente da t ad r.

Le due strutture quaternarie dell'emoglobina.

L'Hb può assumere due strutture quaternarie dette T (deossi) e R (ossi). Queste strutture differiscono soprattutto per le posizioni relative dei due dimeri $\alpha_1-\beta_1$ e $\alpha_2-\beta_2$. Questi dimeri sono identici tra loro ed i numeri 1 e 2 che distinguono le subunità, sono utilizzati per comodità di esposizione (figg. 6-3, 6-8+6-14). Abbiamo visto nel paragrafo precedente che il cambiamento di conformazione (dovuto all'ossigenazione) della subunità α_1 , porta al cambiamento delle interazioni $\alpha_1-\alpha_2$, $\alpha_1-\beta_2$, l'ossigenazione dell' α_2 al cambiamento delle interazioni $\alpha_2-\alpha_1$, $\alpha_2-\beta_1$, l'ossigenazione delle subunità β_1 al cambiamento delle interazioni $\beta_1-\alpha_2$ e l'ossigenazione delle subunità β_2 al cambiamento delle interazioni $\beta_2-\alpha_1$. Questi cambiamenti di interazioni intersubunità sono osservabili confrontando la struttura quaternaria deossi (T) e quella ossi (R) (figg. 6-9+6-14).

Il cambiamento della struttura quaternaria avviene per una rotazione di 15° dei dimeri $\alpha_1 \beta_1$, e $\alpha_2 \beta_2$, con l'asse di rotazione che passa eccentricamente attraverso le due subunità α (figg. 6-9, 6-10) con un avvicinamento delle due subunità β . Poiché l'asse di rotazione passa attraverso le subunità α , la posizione relativa tra queste subunità cambia di poco, cambiano pochissimo i rapporti tra α_1 e β_1 e tra α_2 e β_2 , mentre il maggior spostamento avviene tra le due subunità β e tra α_1 e β_2 e tra α_2 e β_1 . L'avvicinamento tra le subunità β è contemporaneo o preceduto dall'allontanamento del DPG dalla cavità tra le due subunità β (fig. 6-12). Il DPG ostacola il cambiamento di conformazione quaternaria, impedendo proprio l'avvicinamento delle subunità β . Nella Hb-ossi, il DPG ha meno possibilità di interagire con l'Hb perché non è più presente la cavità per accoglierlo, anche se i gruppi con cui interagisce mantengono le loro cariche. Alcuni autori parlano di espulsione del DPG dalla sua cavità per azione dell'avvicinamento delle subunità β . Questo meccanismo si spiega assumendo che l'avvicinamento delle subunità β sia accompagnato dalla rottura di uno o più legami a H-salini tra il DPG e le subunità β , per cui si ha un indebolimento dell'interazione del legante con le subunità β , e ciò favorisce la dissociazione del DPG dall'Hb.

Si può anche assumere che il DPG si allontani dall'Hb prima dell'avvicinamento delle subunità β . L'Hb con l'ossigenazione di due subunità α , perde dei legami quaternari, e sebbene sia ancora in conformazione quaternaria T, questa struttura è meno stabile. In queste condizioni di minore stabilità, l'agitazione termica può essere sufficiente a causare spostamenti relativi tra le subunità β , e quindi a provocare l'indebolimento delle interazioni di DPG con l'Hb. Conseguentemente il DPG si dissocia rendendo possibile il cambiamento di conformazione quaternaria.

Avvenuto il cambiamento di struttura quaternaria, il DPG riduce moltissimo la sua possibilità di associazione con l'Hb (la costante di affinità passa da circa 10^5 M^{-1} a

$<10^3 \text{ M}^{-1}$, cioè è ridotta di più di 100 volte).

Sebbene l'affinità del DPG per l'Hb-ossi sia molto ridotta, la legatura del DPG può sempre avvenire. Si può assumere che la legatura avvenga su 3 residui di una sola subunità β , oppure che il DPG si leghi in un altro sito dell'Hb.

La prima ipotesi è un esempio di affinità condizionata dalla disposizione di più gruppi che devono interagire, piuttosto che dalla reattività (disposizione elettronica su gli atomi) dei singoli gruppi (che nell'Hb si assume essere invariata). Consideriamo ora le diverse interazioni e posizioni della subunità α_1 rispetto alla subunità β_2 e della α_2 rispetto alla β_1 (figg. 6-10, 6-11, 6-13, 6-14). Come già detto, essendo l'asse di rotazione dei dimeri $\alpha_1 \beta_1$, ed $\alpha_2 \beta_2$ eccentrico e sulle subunità α , risulta che gli spostamenti tra α_1 e β_2 (e così tra α_2 e β_1) avvengano in maniera diversa nelle due superfici di contatto (giuntura flessibile e spostamento). Nelle superfici di contatto tra $\alpha_1 \text{FG}$ e $\beta_2 \text{C}$ (detta giuntura flessibile) si hanno cambiamenti di posizione relativamente piccoli, infatti i punti di contatto tra i residui di $\beta_2 \text{C}$ e $\alpha_1 \text{FG}$, Trp $\beta_2 37$ ($\text{C}\beta=3^\circ$ residuo della catena C) contro Asp $\alpha_1 94$ (G1) e contro Pro $\alpha_1 95$ (G2); Arg $\beta_2 40$ (C6) contro Tyr $\alpha_1 42$ (C7) e contro Arg $\alpha_1 92$ (FG4), rimangono invariati nel passaggio da Hb-T (completamente deossigenato) ad Hb-R (ossigenato sulle 4 subunità).

Analoghe considerazioni sono valide per $\beta_1 \text{C}$ ed $\alpha_2 \text{FG}$. Sebbene non si conoscano esattamente le conformazioni dell'Hb-T e dell'Hb-R parzialmente ossigenate, si assume che il cambiamento di conformazione da Hb-T ad Hb-R porti comunque a ridurre (o eliminare) i punti di contatto dei residui delle $\beta_2 \text{C}$ contro la Tyr $\alpha_1 140$, ad indebolire (o spezzare) il legame $\alpha_1-\beta_2$ (tra Arg $\alpha_1 141$ ed il CO della Val $\beta_2 34$) ed indebolire alcuni legami $\alpha_1-\alpha_2$.

Si assume invece che i legami $\alpha_1-\alpha_2$ presenti nell'Hb-T permangano nell'Hb-R non ossigenata (come nell'Hb senza DPG) e siano spezzati solo dopo che le subunità α sono ossigenate. Questo sembra valido in particolare per il legame tra Arg $\alpha_1 141$ e la Val $\alpha_2 1$ (quello la cui rottura porta al rilascio di Cl^- ed al protone di Bohr) e per il legame intrasubunità (Tyr $\alpha_1 140$ con il CO della Val $\alpha_1 93$). Infatti la transizione da Hb-T a Hb-R in assenza di O_2 (Hb senza DPG), cioè con Hb non ossigenata su nessuna subunità, rende le subunità α più libere di cambiare conformazione quando associano l' O_2 , e quindi più affini al legante. In queste stesse condizioni l'effetto cooperativo è fortemente ridotto (curva iperbolica, fig. 6-6), tuttavia esiste ancora l'effetto Bohr indicando che legami salini tra le subunità α sono ancora presenti in molte molecole di Hb.

Tutto ciò è dedotto dal fatto che nell'Hb priva di DPG, che si assume essere nella conformazione R, le subunità α hanno alta affinità per l' O_2 , l'Hb è ancora sensibile alle concentrazioni fisiologiche dei protoni, e le subunità α e β , quando si ossigenano, eseguono cambiamenti di conformazione. Quindi la transizione da Hb-T ad Hb-R in assenza di O_2 , porta a delle variazioni nei rapporti tra FG β ed αC , ciò è dedotto anche dal fatto che quando l'Hb-T ossigenata su α_1 ed α_2 passa ad Hb-R, le subunità α sono più

libere, ed eseguono il passaggio dalla conformazione (terziaria) t^* a quella r , incrementando la loro affinità per l' O_2 già associato. Ciò è ricollegabile a quanto detto sopra: con la transizione quaternaria da T ad R si ha la perdita dei contatti β_2C con la Tyr α_{1140} e la rottura del legame Arg α_{1141} ed il CO della Val β_{234} rendono energeticamente favorevole il passaggio da t ad r . La superficie di contatto tra l'elica α_1C ed il ripiegamento β_2FG (e così tra α_2C e β_1FG), viene anche detta di spostamento (switch) perchè le posizioni relative di queste due parti di subunità subiscono i maggiori spostamenti nei cambiamenti di struttura quaternaria. Nel cambiamento di struttura quaternaria da T ad R, il ripiegamento FG della subunità β_1 (e così anche della β_2) risulta più libero perchè sono spezzati due legami a idrogeno (tra Asp β_{299} (G1) e Tyr α_{142} (C7) e con Asn α_{197} (G4). E' più libera anche la parte carbossi-terminale della β_1 per rottura del legame tra il carbossile terminale stesso e la Lys α_{140} (C5). Inoltre viene rimosso il contatto tra la Tyr β_{2145} e la Thr α_{141} (C6). Questi tre legami non si ritrovano nelle Hb-R anche se le subunità α non sono ancora ossigenate. Nella transizione da T ad R si formano due nuovi legami deboli a causa dell'avvicinamento tra loro di altre parti di α_1 e β_2 (vedere figg. 6-11, 6-14). Un legame si forma tra la Asn β_{2102} (G4) e la Asp α_{194} (FG) e l'altro tra Arg β_{240} (C6) e il CO della Thr α_{140} (C6).

I legami a H intramolecolari delle subunità β al carbossiterminale (His β_{146} (HC3) con Asp β_{94} (FG1) e Tyr β_{145} (HC2) con il CO della Val β_{98} (FG5)), sono presenti anche dopo il cambiamento di conformazione quaternaria perchè sono spezzati successivamente con l'ossigenazione delle subunità β . Tuttavia, con il cambiamento della struttura quaternaria, la stabilità della conformazione t della subunità β , è ridotta per la perdita del legame quaternario tra il gruppo carbossilico del His β_{146} con la Lys α_{40} . Inoltre la subunità β è più libera di cambiare conformazione terziaria perchè è perso il contatto tra la Tyr β_{145} con il residuo Thr α_{41} (C6) (figg. 6-11, 6-14). Quando la Hb è nella conformazione T e si ossigenano le subunità α si ha la rottura di legami intracatena con il cambiamento di struttura terziaria da t a t^* . Con questo cambiamento di struttura terziaria si ha anche la rottura o indebolimento di due legami a H intersubunità (quaternari), che l'Arg α_{1141} (HC3) forma con il CO della Val β_{234} (B16) e con Asp α_{2126} (H9), e sono persi o ridotti i contatti che i residui di Pro β_{236} (C2) e di Trp β_{237} (C3) hanno con la Tyr α_{1140} (HC2). La Tyr α_{1140} subisce uno spostamento quando l' α_1 si ossigena. Identiche rotture di legami e perdite di contatti si hanno con l'ossigenazione delle subunità α_2 . Alcuni autori considerano che le alterazioni della costrizione quaternaria (rottura di legami, perdita di contatti tra residui di subunità diverse, sopra indicati) conseguente l'ossigenazione delle subunità α , siano da considerarsi come cambiamenti di struttura quaternaria, e quindi, oltre alla conformazione T ed R, esisterebbero altre conformazioni quaternarie intermedie a T ed R. In fig. 6-8,

queste conformazioni sono quelle in cui l'Hb-T ha una o più subunità nella conformazione t^* . Complessivamente il cambiamento di conformazione quaternaria (da T ad R) con ambedue le subunità α ossigenate, porta alla rottura di tre legami a H e alla formazione di due nuovi, più la rottura dei sette legami deboli che legano il DPG alle subunità β (figg. 6-11+6-14). Tutti questi legami svolgono un ruolo nell'associazione cooperativa dell' O_2 da parte dell'Hb e nella regolazione di questa associazione da parte dei protoni, CO_2 e del DPG. Altri legami secondari sono presenti tra le subunità, hanno la funzione di mantenere costantemente unite le subunità stesse delle Hb nelle due conformazioni, senza ostacolare i cambiamenti di conformazione.

Sequenza di ossigenazione e dei cambiamenti di conformazione terziaria e quaternaria dell'emoglobina.

In assenza di ossigeno l'Hb è nella conformazione quaternaria deossi, detta anche T e tutte le subunità sono nella conformazione deossi t . Questa conformazione è stabilizzata da un certo numero di legami secondari (a H e salini) che mantengono l'Hb nella struttura quaternaria T. Anche se indicato con T (tense) la struttura non ha tensione interna; la tensione subentra con l'associazione della prima molecola di O_2 ed aumenta con l'ossigenazione delle altre tre subunità, se non avviene prima il cambiamento di struttura quaternaria da T ad R.

Posta in presenza di O_2 , l'Hb si ossigena su una delle due subunità α perchè il Fe-eme delle subunità β è parzialmente coperto dalla Val $\beta 98$ (FG 56).

Quindi a parità di pO_2 esiste una probabilità molto più alta che l' O_2 incontri il Fe-eme α che il Fe-eme β . Chiamiamo α_1 la prima subunità che si ossigena, l' O_2 legato al Fe-eme crea tensione all'interno della subunità perchè O_2 e Fe-eme tendono a formare un legame più forte e la struttura proteica si oppone a questa formazione. La tensione è parzialmente rimossa con un cambiamento di struttura terziaria da t a t^* che fa spostare l'elica F, rompere il legame a idrogeno della Tyr α_{1140} (HC2) e quelli che l'Arg α_{1141} (HC3) ha con i residui o gruppi dell' α_2 e β_2 .

In particolare, la rottura del legame con il gruppo $-NH_3^+$ terminale della Val α_{21} (A1), porta alla liberazione dell'ione Cl^- e del protone di Bohr. Il protone di Bohr è liberato dal gruppo $-NH_3^+$ terminale della Val α_{21} .

Il primo O_2 si lega all'Hb con scarsa affinità, ciò vuol dire che nonostante moltissime molecole di O_2 colpiscano il Fe-eme nell'unità di tempo, solo una parte di esse è trattenuta e per tempi brevissimi.

Ciò è spiegato considerando che l'ossigenazione delle subunità α , chiede la rottura di almeno 5 legami deboli, ma soprattutto perchè il cambiamento di conformazione da t a t^* non rimuove completamente la tensione creata dall'ossigenazione della subunità stessa, e quindi la

subunità può tornare facilmente alla conformazione t ed espellere l' O_2 associato.

Le subunità α ossigenate non passano direttamente dalla conformazione t a quella r (che ha maggiore affinità per l' O_2) perchè sono impedita dalla costrizione quaternaria, cioè dai legami che stabilizzano la conformazione T . Infatti, la tensione causata dall'ossigenazione delle subunità α , è rimossa in parte dal cambiamento di struttura terziaria da t a t^* e con questo cambiamento di conformazione è in parte trasferita a tutto il tetramero in conformazione T .

Riassumendo: con l'ossigenazione della prima subunità α e conseguente cambiamento di struttura terziaria da t a t^* si ha un indebolimento della struttura T per perdita di legami deboli che la stabilizzavano e perchè viene indotta una tensione in tutta la molecola di Hb che può essere rimossa con il cambiamento di conformazione dell'Hb da T ad R , cambiamento che permetterebbe il cambiamento di struttura terziaria delle subunità α_1 da t^* ad r , e quindi di rimuovere la tensione residua presente nella subunità stessa.

La seconda subunità α (α_2) associerà l' O_2 con scarsa affinità per le stesse ragioni indicate per l'ossigenazione dell' α_1 . Le due subunità α sono identiche ed hanno interazioni identiche tra loro e con le subunità β . Tuttavia si assume che la seconda subunità α (α_2) sia più affine all' O_2 della prima perchè la sua ossigenazione richiederebbe meno energia dell'ossigenazione della prima (α_1).

L'ossigenazione dell' α_1 ha indebolito la struttura quaternaria T (rottura di legami intercatena e tensione sul tetramero) e tale conformazione deve resistere all'azione disgregante del calore a $37^\circ C$ con un numero inferiore di legami, i quali risulteranno più sollecitati e quindi più deboli. Risulteranno più deboli anche i legami all'estremo carbossilico della subunità α_2

($\alpha_2-\alpha_1$, $\alpha_2-\beta_1$) che si devono spezzare in seguito al cambiamento di conformazione che la subunità α_2 compie quando viene ossigenata. Essendo i legami più deboli, è richiesta meno energia libera per associare l' O_2 alla subunità α_2 di quella richiesta per ossigenare l' α_1 . Quindi la seconda subunità α (α_2) risulterà più affine all' O_2 della prima subunità α (α_1) che si è ossigenata. Con l'ossigenazione della seconda subunità α_2 , la struttura quaternaria T dell'Hb è ulteriormente indebolita e sottoposta ad una tensione maggiore.

Sebbene per passare alla conformazione R sia necessario spezzare altri legami secondari e dissociare il DPG, si assume che il cambiamento totale di struttura quaternaria da T ad R sia energeticamente possibile.

Il cambiamento di struttura quaternaria richiede la rottura netta di 19 legami deboli (si rompono 23 legami deboli e se ne riformano 4, di cui 7 del DPG con le subunità β , fig. 6-14). Tuttavia, se consideriamo che, con l'ossigenazione delle due subunità α , l'Hb ha già perso 10 legami deboli (8 intrasubunità e 2 intersubunità), cioè poco meno della metà dei legami che stabilizzavano la

conformazione Hb-T, i rimanenti legami deboli devono sopportare il doppio delle sollecitazioni provocate dall'agitazione molecolare.

Si può assumere quindi che la sola agitazione molecolare sia energeticamente sufficiente a provocare il cambiamento di conformazione da T ad R in molte molecole di Hb presenti nel globulo rosso.

Con l'Hb nella conformazione R, le subunità α_1 ed α_2 ossigenate e nella conformazione t^* , non sono più impedito ad assumere la conformazione r, che assumono risultando così più affini all' O_2 .

Con il cambiamento di struttura da T ad R dell'Hb, anche le subunità β divengono molto affini all' O_2 anche se non hanno ancora legato l' O_2 e sono ancora nella conformazione t.

Ciò è dovuto al fatto che con il cambiamento di struttura quaternaria da T ad R, le subunità β risultano non impedito a cambiare conformazione da t ad r, essendo rimossi i legami ed i contatti tra i ripiegamenti FG β e le eliche C α .

Non si può escludere che la subunità β ossigenandosi assuma per qualche tempo la conformazione t^* , tuttavia l'evoluzione alla conformazione r sarà rapida perchè non ostacolata.

Inoltre il cambiamento di struttura terziaria da t a t^* delle subunità β , richiede meno energia di quello della subunità α , perchè è associato alla rottura di solo 2 legami deboli quando l'Hb è nella conformazione R (di 3 legami deboli se l'Hb è nella conformazione T). Con Hb in R, le subunità β hanno alta affinità per l' O_2 pur conservando la struttura terziaria t, e quindi anche il residuo di Val β 98 (FG5) che limita l'accesso dell' O_2 al Fe-eme.

Si assume che la struttura t delle subunità β , nelle condizioni su esposte, sia ormai una struttura poco stabile, per cui le subunità possono oscillare tra la conformazione t e t^* (o conformazioni intermedie) con frequenze molto alte per azione del calore a 37°C e quindi avere costanti cinetiche di associazione dello stesso ordine di grandezza delle subunità α .

Il cambiamento da t a t^* delle subunità β è associato allo spostamento della Val β 98 e quindi all'apertura del passaggio dell' O_2 verso il Fe-eme. Quindi l'incremento della affinità dell' O_2 delle subunità β è determinato dalla maggiore libertà di movimento delle subunità stesse, dal minor numero di legami deboli da spezzare con il cambiamento di conformazione da t ad r e dal fatto che la subunità β può assumere spontaneamente a 37°C, la conformazione t^* od altre, che comunque permettono l'accesso dell' O_2 fino al Fe-eme. Si assume che con Hb-R la subunità β che si ossigena per seconda (β_2), sia più affine all' O_2 della prima, anche se il cambiamento di conformazione da t ad r richiede la rottura dello stesso numero di legami. Infatti, l'Hb-R con tre subunità in r (α_1 , α_2 , β_1) è più stabile che con due (α_1 ed α_2) e quindi è più probabile trovare nella conformazione R un tetramero di Hb' con tre subunità in r che con due sole. L'Hb-R ossigenato su tre subunità infatti, per tornare nella conformazione T deve dissociare prima un O_2 della subunità β , altrimenti la transizione risulta molto improbabile, l'Hb-R con solo le due subunità α ossigenate ha più

probabilità di tornare alla forma T.

L'ossigenazione della prima subunità β favorisce lo spostamento dell'equilibrio conformazionale verso la forma R, per cui l'ossigenazione della seconda subunità β può avvenire più rapidamente della prima perchè esposta ad un maggior numero (concentrazione) di Hb nella conformazione R. Da ciò si può dedurre che la subunità β_2 ossigenandosi per seconda, risulta più affine all' O_2 della prima perchè, a parità di concentrazione di Hb e di O_2 , esistono più subunità β capaci di associare l' O_2 , anche se cambiano conformazione con una richiesta energetica uguale a quella della subunità β_1 che si è ossigenata per prima.

Si ritiene che, nelle condizioni fisiologiche, il cambiamento di conformazione da T ad R possa avvenire in media dopo che due o tre subunità si sono ossigenate. Quindi in alcuni casi l'incremento di affinità imputabile alla cooperatività dovuta alla transizione da T ad R, avviene con due subunità ossigenate (α_1 ed α_2), in altri casi, anche se ossigenata sulle due subunità α , l'Hb non cambia conformazione quaternaria per un tempo sufficientemente lungo, per cui si ha l'ossigenazione di una subunità β , la quale passerà dalla conformazione t a quella t^* e, come visto per le subunità α , ciò indebolirà ulteriormente la conformazione T dell'Hb con la rottura di un legame quaternario (tra il carbossile del His β 146 (HC3) ed il residuo di Lys α 40 (C5)) ed introducendo tensione tra i ripiegamenti FG β e l'elica C α .

Si assume che in alcuni casi la transizione da T ad R del tetramero, avvenga dopo che si è ossigenata la seconda subunità β , quindi l'incremento di affinità dell'Hb verso l' O_2 avverrebbe dopo che tutte le subunità sono ossigenate. Questo è un evento improbabile ma possibile (vedere fig. 6-8), tuttavia anche così si ha l'effetto cooperativo perchè l'Hb ha due valori di affinità in relazione al suo stato di ossigenazione.

Alcuni autori hanno proposto che, anche nel caso che l'ossigenazione delle 4 subunità avvenga su un tetramero di Hb che mantiene la conformazione T, ci sia effetto cooperativo anche se di minore entità (le subunità che si ossigenano dopo la prima hanno maggiore affinità per l' O_2 , e così via).

Ciò può essere spiegato considerando che le ossigenazioni rendano il tetramero meno stabile (vedi sopra), e quindi la costrizione quaternaria sulle subunità diviene meno forte (meno legami) in relazione diretta al numero delle subunità ossigenate, e perchè le subunità β , per cambiare conformazione da t a t^* , richiedono la rottura di un numero di legami deboli inferiore a quello richiesto dalle subunità α .

Alcune considerazioni sul meccanismo molecolare di ossigenazione dell'Hb.

Il meccanismo molecolare proposto per l'ossigenazione

dell'Hb, in cui l'ossigenazione delle prime subunità favorisce l'ossigenazione delle rimanenti, implica che, a qualsiasi pressione parziale di O_2 (pO_2), le singole molecole di Hb siano prevalentemente nella forma in cui nessuna subunità è ossigenata, od in quella in cui tutte le subunità hanno associato l' O_2 .

Le molecole di Hb con stati di ossigenazione intermedi saranno pochissime, perchè la parziale ossigenazione favorisce il completamento dell'ossigenazione della singola molecola di Hb, e le molecole di Hb che non hanno associato alcuna molecola di O_2 , sono più stabili in quella condizione che parzialmente ossigenate.

Le molecole che hanno associato una o due molecole di O_2 , se non evolvono verso l'ossigenazione completa in conseguenza di un incontro con l' O_2 , tendono a dissociare O_2 ed a tornare nella forma completamente deossigenata.

Perutz, per spiegare il fenomeno, usa un verso del Vangelo con le parole di Gesù Cristo (Marco, Cap.4, V.25): "A chi ha sarà dato".

Cioè, le molecole di Hb che hanno associato un pò di O_2 (2-3 molecole di O_2) saranno preferite nella ossigenazione rispetto a quelle molecole di Hb che non hanno associato nessuna molecola di O_2 .

L'ossigenazione dell'Hb, come la Fede (senza mancare di rispetto ai credenti), ed anche molte altre cose della vita terrena, sono dotate di cooperatività positiva. Successivamente Perutz ha proposto il V.12 completo del Cap. 13 di S. Matteo: "A chiunque ha sarà dato e sarà nell'abbondanza, ma chiunque non ha sarà tolto anche quello che ha". In questo caso l'autore vuol dire che le singole molecole di Hb, relativamente all'ossigenazione, rispondono alle legge del tutto o nulla.

La spiegazione dell'effetto cooperativo dell'Hb è stata portata avanti utilizzando come modello una singola molecola. Basandosi sul meccanismo di ossigenazione di una singola molecola di Hb, non si ha la visione di come avviene l'ossigenazione in vivo, ed è difficile collegare il meccanismo molecolare di ossigenazione dell'Hb alla sua curva sigmoide di saturazione da O_2 . Infatti, la curva di ossigenazione di un numero grande di molecole di Hb non risulta dalla sequenza di ossigenazione ($\alpha_1 > \alpha_2 > \beta_1 > \beta_2$), secondo il meccanismo molecolare proposto (figg. 6-8 e 6-14), e sincronicamente per tutte le molecole di Hb. Cioè, per prime si ossigenerebbero tutte le subunità α_1 di tutte le molecole di Hb presenti e poi le subunità β delle stesse molecole. Il meccanismo molecolare dell'effetto cooperativo e prove sperimentali dirette, indicano che le molecole di Hb che si ossigenano sulle prime subunità (2α oppure 2α ed 1β), sono preferite rispetto alle molecole di Hb ancora non ossigenate, e che la curva di saturazione dell'Hb da O_2 rappresenta le quantità relative di molecole di Hb ossigenate sulle quattro subunità e di quelle non ossigenate del tutto alle date pO_2 . A pO_2 uguale a zero, il 100% di Hb è deossigenata, mentre a pO_2 saturante (circa 100 mm di Hg) il 98-100% delle Hb sarà ossigenato sulle 4 subunità. A pO_2

intermedie si avranno valori intermedi delle due forme di Hb; mentre a tutte le pO_2 esisteranno poche molecole di Hb parzialmente ossigenate perchè rappresentano lo stato più instabile tra le due forme di Hb sopra indicate. Resta da spiegare come con il meccanismo molecolare di ossigenazione che risponde alla legge del tutto o nulla, si osservi sperimentalmente una curva sigmoide.

Assumiamo di avere una soluzione contenente molte molecole di Hb in assenza di O_2 , e che tutte le molecole di Hb siano allo stesso livello energetico e che tutte le molecole di Hb siano nella conformazione T (fig. 6-19).

Aggiungendo O_2 , a basse pO_2 nessuna molecola di Hb legherà O_2 sulla prima subunità per tempi sufficientemente lunghi da permettere la seconda ossigenazione ed innescare l'effetto cooperativo.

Quindi la subunità rilascerà rapidamente l' O_2 associato. Ciò è dovuto alla costrizione quaternaria (legami deboli che stabilizzano la conformazione T) che si oppone all'ossigenazione rendendo difficili i cambiamenti conformazionali delle subunità.

Aumentando la pO_2 si arriverà ad una frequenza di incontri tra O_2 ed Hb tale che l'associazione della prima molecola di O_2 sia sufficientemente frequente e/o sufficientemente lunga da favorire l'associazione dell' O_2 sulla seconda subunità e quindi evolvere rapidamente verso una completa ossigenazione dell'Hb.

Essendo le molecole di Hb allo stesso livello energetico, si ossigeneranno tutte insieme, e se ammettiamo che una volta ossigenate le molecole di Hb non rilascino l' O_2 come in una reazione irreversibile, non ci sarà dissociazione della Hb ossigenata. La curva sarà una retta perpendicolare all'asse delle ascisse ad una data pO_2 , che si ipotizza essere 26 mm di Hg (vedere fig. 6-19a).

Se ora ammettiamo che le molecole di Hb siano sempre tutte allo stesso stato energetico e strutturale, ma che leghino reversibilmente l' O_2 , l'ipotetica curva di ossigenazione è una spezzata (fig. 6-19b) perchè i complessi HbO_2 tendono a dissociarsi, e quindi occorrono pressioni di pO_2 maggiori dopo che si è ossigenata la prima subunità, al fine di mantenere complessate con l' O_2 le subunità che sono già ossigenate. La spezzata è anche la curva di ossigenazione di una singola molecola di Hb che abbia legato il primo O_2 alla pO_2 di 26 mm di Hg.

Se ammettiamo che le molecole di Hb siano allo stesso stato energetico e strutturale prima dell'ossigenazione della prima subunità, ma non dopo, la curva di ossigenazione sarà una iperbole con valore di % di saturazione uguale a zero, con pO_2 da 0 a 26 mm di Hg (fig. 6-19b).

Quando osserviamo il fenomeno in condizioni in cui nella soluzione sono presenti Hb in stadi energetici diversi, quando viene introdotto O_2 a basse pO_2 , molte molecole del gas si legheranno inizialmente a molte molecole di Hb su una sola subunità α data la casualità degli urti;

successivamente gli O_2 liberi tenderanno a completare l'ossigenazione di singole molecole di Hb. Anche gli O_2 dissociatisi da molecole di Hb ossigenate su una subunità,

preferiranno associarsi ad Hb parzialmente ossigenate, perchè dotate di maggiore affinità. Così si avranno, anche a basse pO_2 , molecole di Hb ossigenate completamente e la maggioranza di Hb deossigenate completamente.

Con gli incrementi di pO_2 verranno ossigenate altre molecole di Hb non ossigenate, e così fino alla saturazione di tutte le molecole di Hb. In queste condizioni di ossigenazione la curva è sigmoide, mostra un flesso verso l'alto sino al 50% di saturazione alla pO_2 di 26 mm di Hg (fig. 6-19c), indicando un incremento di affinità verso l' O_2 dell'Hb.

Successivamente la curva ha un flesso verso destra e tende ad un plateau in conseguenza della riduzione del numero di molecole di Hb libere da O_2 , cioè per saturazione e non per ridotta affinità delle molecole stesse, che è molto alta. Il flesso verso l'alto della curva di ossigenazione è spiegato considerando che gli incrementi di ossigenazione interessano progressivamente numeri maggiori di molecole di Hb in relazione al maggiore pO_2 , cioè al numero di molecole di O_2 presenti in soluzione. Ciò avviene fino a quando circa il 50% di Hb è ossigenato ($pO_2 = 26$ mm di Hg), dopo di che l'effetto di saturazione diviene prevalente sull'effetto cooperativo che rimane presente.

La combinazione dei due effetti nella curva di saturazione risulta in un flesso verso destra e poi nel plateau.

L'effetto cooperativo appare come un meccanismo per spostare la linearità della curva di saturazione a concentrazioni (pO_2 nel caso dell'Hb) più alte. Quindi la costrizione quaternaria, cioè i legami che devono essere spezzati per realizzare la prima associazione, rappresenta una forma di energia di attivazione che può essere superata solo dopo certe concentrazioni del legante.

Meccanismo molecolare della deossigenazione dell'Hb.

Le proprietà di regolazione dell'affinità dell'Hb sono utilizzate nella deossigenazione piuttosto che nella ossigenazione. Alle pO_2 polmonari, sia Hb che Mb sono saturate dall' O_2 , quindi non appare importante avere o meno l'effetto cooperativo per ottenere una saturazione pressochè completa.

Nella deossigenazione le molecole di Hb perdono la prima molecola di O_2 con la stessa difficoltà della Mb, tuttavia, persa la prima ed in alcuni casi anche la seconda molecola di O_2 , l'Hb tenderà a perdere le altre molecole di O_2 a lei associate, per decrementi di pO_2 minori di quelli richiesti per dissociare le prime molecole di O_2 . Questo perchè la perdita delle molecole di O_2 causa, nelle molecole di Hb che le hanno perse, una caduta di affinità verso l' O_2 .

L'Hb rilascia circa il 40% di O_2 alle pO_2 dei capillari. Tale quantità di rilascio non si realizzerebbe se il trasportatore di O_2 fosse la Mb, che ha affinità costante per l' O_2 , e per rilasciare la stessa quantità di O_2 rilasciata dall'Hb, dovrebbe essere esposta a pO_2 vicine allo zero. Basse pO_2 non sono fisiologiche, perchè fanno rallentare la reazione citocromoossidasi e quindi la

fosforilazione ossidativa. Il rallentamento della fosforilazione ossidativa causa una diminuzione della C_{ss}-ATP cellulare e quindi di tutti i processi cellulari che utilizzano ATP (contrazione muscolare, sintesi, trasporto soluti, ecc.) e porta alla morte cellulare.

Il meccanismo molecolare di deossigenazione non è altro che l'inverso di quello di ossigenazione, con la perdita del primo O₂, la subunità β assume la conformazione terziaria t e lega il protone di Bohr. L'O₂ rilasciato nel globulo rosso e poi nel sangue, non va ad incrementare la pO₂ del capillare perchè passa nella cellula e viene utilizzato nel metabolismo ossidativo. Quindi è improbabile che ci sia a livello dei capillari, una riassociazione di O₂ all'Hb parzialmente deossigenata. Nello stesso modo può essere rilasciato l'O₂ dell'altra subunità β che ha minore affinità per l'O₂ della prima che si è dissociata. Dopo che le due subunità β si sono dissociate, l'Hb passa dalla conformazione R a quella T e riassocia il DPG che la stabilizza nella conformazione T. L'energia necessaria è liberata con la formazione dei legami quaternari e del DPG. L'assunzione della conformazione T, causa una tensione nelle subunità α ancora ossigenate che sono indotte a passare dalla conformazione r a quella t*. In questo modo le subunità α hanno una riduzione di affinità per l'O₂, e tendono a rilasciare O₂ anche se la pO₂ non è diminuita. Lo scopo dell'effetto cooperativo è proprio questo, ridurre l'affinità dell'Hb al fine di provocare un rilascio di O₂ per variazioni di pO₂ relativamente piccole aventi valori relativamente alti.

Considerando l'Hb come un congegno meccanico, si può pensare che la struttura quaternaria T agisca sulle subunità α ancora ossigenate, come una molla carica, che è rilasciata solo quando le subunità α riassumono la conformazione t. Ciò favorisce l'espulsione dell'O₂. Tuttavia, la riassunzione della conformazione t può essere indotta e quindi precedere la dissociazione dell'O₂ dalla subunità. Così tale subunità sarà caricata di una ulteriore tensione che risulterà in un rapido rilascio di O₂.

Le subunità α che si deossigenano cambiano conformazione da t* a t, assumono il protone di Bohr e lo ione Cloro, o formano carboamino derivati, riformano i legami deboli intra ed intersubunità, ed in questo modo la tensione all'interno del tetramero Hb è rimossa.

Ora la conformazione T è nella sua forma più stabile ed è improbabile che l'Hb si riossigeni nonostante la pO₂ relativamente alta presente nei capillari. A pO₂ costanti corrisponde una C_{ss}-O₂ costante, cioè a livello dei capillari c'è un continuo flusso di O₂ verso le cellule, in relazione all'attività ossidativa delle stesse, che creano piccole cadute della C_{ss}-O₂ intracellulare per favorire il flusso di O₂ dai capillari. Alla stessa pO₂ si ossigena completamente la Mb delle fibre muscolari.

Gli incrementi di C_{ss}-H⁺ che avvengono nei globuli rossi per vari motivi (attivo metabolismo aerobico, anaerobico), favoriscono la riformazione dei legami salini intrasubunità delle subunità β e quelli intersubunità delle α , e quindi la riassunzione da parte delle subunità, delle conformazioni t o t*. Le subunità in conformazione t o t* favoriscono la

riassunzione della conformazione T da parte dell'Hb, che provoca la caduta dell'affinità dell'Hb verso l'O₂ (effetto Bohr).

Quindi l'effetto Bohr provoca la dissociazione dell'O₂ da un maggior numero di molecole di Hb, di quello che si avrebbe in assenza di incrementi della C_{SS-H^+} nei globuli rossi. Considerando ancora l'Hb come un congegno meccanico, i legami salini rappresentano anch'essi delle molle che possono essere caricate e creare una tensione all'interno delle subunità, tensione che favorisce l'espulsione dell'O₂. La particolarità è che le molle possono essere caricate per azioni ambientali (incremento della C_{SS-H^+}) ed indipendentemente dalla pO₂.

L'effetto Bohr non è determinato solo dai gruppi responsabili dei legami salini posti ai terminali carbossilici delle subunità α e β .

Ambedue i gruppi carbossi-terminali delle subunità α contribuiscono per il 25%, i due gruppi carbossi-terminali delle subunità β per il 40%. L'His α 122 (H5) contribuisce per un 10%, tuttavia la ragione del contributo è ignota perchè non ci sono apparenti cambiamenti di conformazione nella regione nelle condizioni in cui l'istidina α 122 è protonata (deossi-Hb) e quando è deprotonata (ossi-Hb). Altri residui contribuiscono all'effetto Bohr: His β 143 (H21) e Lys β 144 (HC1) sono poste nella zona di legame del DPG: l'His β 143 forma con il DPG un legame salino. Si assume che l'effetto Bohr sia il risultato di piccoli contributi di molti residui aminoacidici, la cui disposizione e reattività è rispettivamente diversa se l'Hb è nella conformazione T od R.

L'Hb, la proteina più conosciuta a livello molecolare, ha ancora segreti.

La conoscenza del meccanismo molecolare di ossigenazione dell'Hb, ha permesso di chiarire anche il meccanismo di azione del DPG. Il DPG può legarsi sia alla Hb ossigenata (R) che a quella deossigenata (T); tuttavia la sua affinità è per l'Hb ossigenata 100 volte inferiore rispetto a quella deossigenata, ma ha sempre l'alto valore di $10^3 M^{-1}$.

A parità di pO₂, se la C_{SS-DPG} aumenta, aumenterà anche il numero di molecole di Hb nella conformazione T.

Supponiamo che una soluzione contenente Hb e DPG 5 mM sia sottoposta alla pO₂ di 100 mM di Hg, per cui circa il 98% dell'Hb sia nella conformazione ossigenata. Aumentando la C_{SS-DPG} a 8 mM, l'Hb ossigenata scende a circa il 93%.

L'effetto del DPG si spiega considerando che, a pO₂ costanti, i complessi Hb-O₂ sono in equilibrio dinamico con l'O₂ e con l'Hb deossigenata. Quando l'Hb si deossigena, associa il DPG, che essendo presente in maggiore concentrazione, rende più improbabile la riassociazione dell'O₂ all'Hb. Il DPG può associarsi anche ai Hb-O₂ ed indurre la riassunzione della conformazione T che causerà tensione nella molecola di Hb, e quindi nelle subunità ossigenate, che avranno perciò una affinità ridotta verso l'O₂. Una volta deossigenate, le subunità assumeranno la conformazione t, e la tensione sarà rimossa. Il DPG già legato incrementerà di 100 volte la sua affinità per l'O₂, e sarà più improbabile che si dissocia dall'Hb. Si assume che il DPG induca la dissociazione dei complessi Hb-O₂ agendo

preferenzialmente sulle molecole di Hb parzialmente deossigenate.

Quindi il DPG può causare direttamente la dissociazione dell'O₂ dall'Hb oltre che rendere più difficile l'ossigenazione dell'Hb.

Tutte e due gli effetti rendono l'insieme delle molecole di Hb meno affini all'O₂. Sappiamo che con la deossigenazione delle subunità e la loro transizione da r a t, si riformano legami salini e quindi c'è riassunzione dei protoni di Bohr. La riassunzione della conformazione T da parte del Hb, avviene anche se non c'è un incremento di Cys-H^+ , data la presenza costante di protoni ai pH fisiologici. La riassunzione dei protoni è favorita dal DPG che stabilizza la Hb nella conformazione T, e l'Hb nella conformazione T è più affine ai protoni.

L'effetto del DPG su H⁺ ed O₂ è allosterico perchè mediato dalla proteina Hb mediante cambiamenti conformazionali.

Il DPG regola l'affinità dell'Hb, agendo primariamente sulla struttura quaternaria (T ed R) e tramite questa sulla struttura terziaria delle subunità. I protoni agiscono primariamente sulla struttura terziaria (t ed r) e tramite questa su quella quaternaria.

L'associazione alla Hb del DPG non è e non può essere cooperativa perchè una sola molecola di DPG si lega alla Hb, mentre l'associazione dei protoni è cooperativa.

L'azione del DPG è pronta come quella dei protoni, cioè variando la Cys-DPG , viene prontamente influenzata l'affinità dell'Hb, perchè è sufficiente l'associazione del DPG alla proteina come lo è per i protoni. Tuttavia, fisiologicamente l'azione del DPG è lenta perchè l'incremento della sua concentrazione nei globuli rossi, a differenza di ciò che avviene per i protoni, richiede varie ore.

Hb fetale.

L'emoglobina fetale (HbF) è una emoglobina costituita da due subunità α e da due γ che sostituiscono le subunità β della emoglobina dell'adulto (HbA).

La sostituzione delle subunità con le β inizia circa dopo l'8° mese di gestazione ed è quasi completa 6 mesi dopo la nascita. Le subunità γ sono costituite da 146 aminoacidi, di cui 37 differiscono da quelli delle subunità β . In particolare, sono sostituiti due aminoacidi nella zona di legame del DPG. L'istidina β 143 è sostituita nella subunità γ con una serina, cioè un aminoacido carico positivamente è sostituito con uno polare. Inoltre le subunità hanno una fenilalanina al posto della leucina β 3. La fenilalanina ha un residuo più ingombrante della leucina e forse può causare lo spostamento del gruppo aminoterminale (β_1) e dell'istidina β_2 .

La perdita dei due legami a H-salini tra le subunità γ ed il DPG, forse accresciuto dallo spostamento della parte N-terminale, causa una riduzione dell'affinità dell'HbF per il DPG, che risulta essere circa 6-8 volte inferiore a quella della HbA. L'HbA ha per il DPG una $K_a = 10^5 \text{ M}^{-1}$ e l'HbF = $1,5 \times 10^3$ (fig. 2-6)

Questi dati sono molto interessanti perchè hanno permesso di chiarire un paradosso. Il sangue fetale ha affinità per l'O₂ maggiore di quella del sangue adulto, mentre l'HbF e l'HbA purificate, hanno, in assenza di DPG, valori di affinità invertiti, rispetto al sangue da cui provengono (cioè senza DPG, l'HbA ha affinità per l'O₂ maggiore di quella del HbF); inoltre il sangue fetale e quello adulto hanno valori di concentrazione di DPG uguali.

Il paradosso è stato chiarito con la definizione della struttura (primaria, secondaria e terziaria) dell'Hb e quindi del sito di legame del DPG.

In assenza di DPG, l'HbA ha maggiore affinità per l'O₂ della HbF in relazione alle loro differenze strutturali (subunità β e γ). La presenza di DPG modifica i valori di affinità per l'O₂ di ambedue le emoglobine, in relazione all'affinità che le emoglobine stesse hanno per il DPG.

Le subunità γ , avendo il sito di legame del DPG modificato, sono meno affini al DPG. Quindi il complesso HbF-DPG è più instabile del complesso HbA-DPG, ed alle stesse pO₂ sarà energeticamente più facile che, con l'ossigenazione delle prime subunità, l'HbF dissoci il DPG e passi nella conformazione R, più di quanto lo sia per la Hb-A. E' probabile che un certo numero di HbF si trovi sempre nella forma "spogliata" (senza DPG), tuttavia questo numero deve essere piccolo perchè l'HbF ha la curva di saturazione sigmoide (fig. 6-20) che indica la presenza della transizione da T ad R in conseguenza della ossigenazione, e quindi una HbF complessata con il DPG a basse pO₂.

Le diverse affinità per l'O₂ delle due emoglobine (HbF ed HbA), risulta da una diversa affinità per il DPG e non da una diversa reattività del Fe-eme all'O₂, come dimostrato dagli esperimenti di ossigenazione delle due globine in assenza di O₂. La maggiore affinità della HbF rispetto alla HbA, favorisce il passaggio dell'O₂ attraverso la placenta, mantenendo pO₂ di poco più basse nella circolazione fetale rispetto a quella materna. Le minori pO₂ della circolazione fetale sono sufficienti a mantenere il metabolismo ossidativo, relativamente limitato al feto.

L'esistenza dell'HbA ed HbF ci indica che l'Hb è un congegno molecolare le cui parti possono anche essere sostituite per adattare la sua funzione a condizioni diverse (trasporto dell'O₂ nel feto e nell'adulto). Poichè ciò è realizzato con relativamente piccole modifiche (sostituzione di 37 residui aminoacidici tra β e γ), se ne è dedotto che i vari tipi di subunità di globina siano originati da un gene ancestrale che si è duplicato alcune volte e che i geni abbiano accumulato mutazioni che hanno portato alla formazione delle subunità α , β , γ , δ , ecc.

Questo è un altro esempio di come la conoscenza della struttura di una macromolecola sia la migliore via per chiarire il meccanismo(i) di funzionamento della macromolecola nelle condizioni fisiologiche, specialmente quando l'attività biologica è influenzata dall'ambiente in cui si trova la macromolecola.

Lo studio delle macromolecole che porta ad associare una funzione biologica ad una macromolecola o a parti di essa (subunità, siti di regolazione, ecc.), è definito come biologia molecolare.

La definizione della struttura dell'Hb e quindi del meccanismo molecolare di ossigenazione dell'Hb e della sensibilità dell'Hb all'ambiente, cioè a H^+ , DPG, CO_2 è, per chi ha desiderio di conoscenza, uno dei più interessanti e meglio conosciuti problemi della biologia molecolare. A questa risoluzione hanno contribuito anche bravi ricercatori italiani.

Tabella 6-1

(Da W.F. Ganon, Review of Medical Physiology, 6th Ed., Lange, 1973, Los Altos, California, USA).

- 1, contengono circa 16 gr di Hb nell'uomo e 14 gr nella donna.
- 2, combinati con l'Hb: O_2 con il Fe-eme e la CO_2 come carboamino derivati.

In condizioni di riposo i tessuti assumono circa 4,6 ml di O_2 da ogni ml di sangue (0,17 ml di O_2 in soluzione e 4,43 ml combinati con l'Hb). In questo modo sono trasportati dai polmoni ai tessuti 250 ml di O_2 /minuto, 360 litri al giorno. Nello stesso tempo i tessuti rilasciano, in 100 ml di sangue, 5 ml di CO_2 di cui 0,5 (10%) rimangono in soluzione, 1 ml (20%) forma carboamino derivati, 3,5 ml (70%) forma acido carbonico che si dissocia in HCO_3^- . Circa il 30% di HCO_3^- rimane nel globulo rosso ed il 70% diffonde nel plasma. In questo modo sono trasportati dai tessuti ai polmoni 200 ml di CO_2 ogni minuto, e circa 290 litri al giorno.

Queste quantità di O_2 e CO_2 aumentano notevolmente (più di 15 volte) durante l'esercizio fisico.

Tab.6-1

	SANGUE					
	ARTERIE			VENE		
pO ₂	95 mm Hg			40 mm Hg		
pCO ₂	40 mm Hg			46 mm Hg		
Hb	97 % satur.			75 % satur.		
	ml di gas contenuti in 100 ml di sangue ¹					
	disciolti	combin. ²	HCO ₃ ⁻	disciolti	combin. ²	HCO ₃ ⁻
O ₂	0,29	19,5	/	0,12	15,1	/
CO ₂	3	3	44	3,5	4	47,5
N ₂	0,98	/	/	0,98	/	/

Fig. 6-1

Struttura terziaria della Mb.

La struttura terziaria (tridimensionale) della Mb è costituita da segmenti in α elica che si interrompono nei punti di ripiegamento. L'eme è inserito nella molecola proteica, con i residui propionici verso l'esterno.

a) I segmenti in α elica ed i ripiegamenti sono indicati come cilindri, all'interno di essi è schematizzata la struttura in α elica senza residui aminoacidici (eccetto che per l'istidina distale 64 (E7) e quella prossimale 93 (F8). L'eme è rappresentato come un disco con al centro una sfera nera (Fe^{2+}) a cui è legato l' O_2 .

b) La figura mostra i contorni di un modello di Mb in cui sono presi in considerazione tutti gli atomi della Mb. Gli atomi sono rappresentati secondo il modello "spaziale". Nel modello "spaziale" l'atomo è rappresentato con le dimensioni proporzionali ai propri raggi di van del Waals. In scuro sono gli atomi dell'eme. Il modello mostra che l'eme è contenuto in una "tasca" della molecola proteica che ha un piccolo passaggio per l' O_2 , dalla parte dell'istidina distale (F8) è anche indicata una parte di catena in α elica (a) e b) da Dickerson and Geis, Hemoglobin, Benjamin, Menlo Park, Ca, USA, 1983. Ridisegnato e parzialmente modificato).

c) Formula di struttura dell'eme e modello spaziale dell'eme (da Lehninger, Principles of Biochemistry, Worth, 1982). Ridisegnato e parzialmente modificato). Nel modello spaziale su alcuni atomi sono scritti i rispettivi simboli al fine di favorire l'identificazione. La formula di struttura rende visibili le posizioni relative ed i legami tra gli atomi, ma non è reale per quanto riguarda le distanze atomiche, ed inoltre dà l'indicazione non reale che esistano grandi spazi vuoti tra gli atomi, attraverso i quali potrebbero passare piccole molecole ed ioni. Il modello "spaziale" mostra come è in realtà la molecola e mostra che tra gli atomi gli spazi sono molto piccoli o inesistenti.

d) Schema delle posizioni del Fe-eme, l'istidina prossimale (F8), quella distale (E7), ed O_2 .

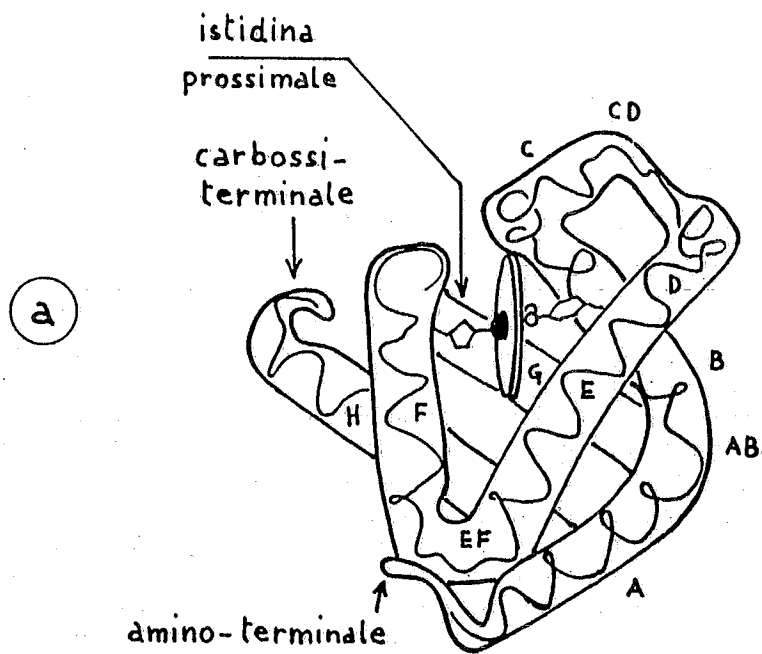
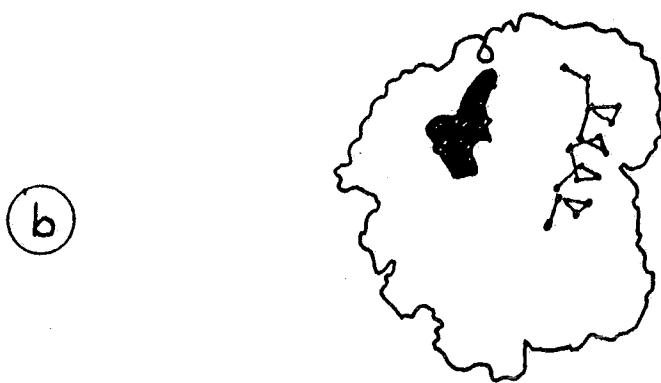


Fig. 6-1



(c)

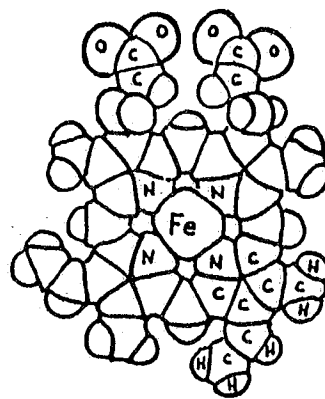
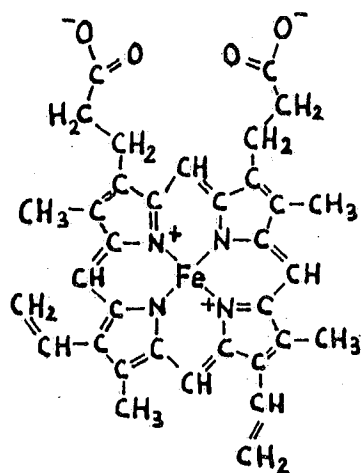
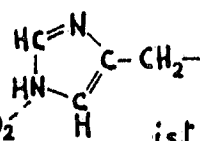
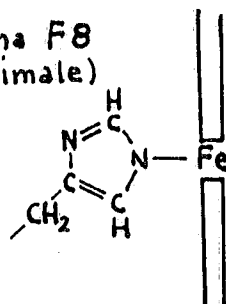


Fig. 6 - 1

(d)

istidina F8
(prossimale)



istidina E7
(distale)

Fig. 6-2

Meccanismo molecolare di trasporto degli acidi grassi (AG) da parte dell'albumina (Al) del siero.

Lo schema mostra che il trasporto è realizzato mediante lo spostamento dell'equilibrio della reazione di formazione del complesso albumina-acido grasso.

a) L'acido grasso liberato dall'adipocita nel vaso sanguigno, incontra l'albumina e forma il complesso che verrà trasportato dal sangue. Il complesso è trasportato per via ematica, e nei capillari che irrorano cellule che utilizzano acidi grassi (es. fibre muscolari), l'acido grasso entra nella fibra muscolare a l'albumina viene trasportata via con il sangue.

Nel capillare che irrori gli adipociti è favorita la formazione del complesso perchè gli acidi grassi sono abbondanti, in seguito alla lipolisi negli adipociti; nel capillare che irrori le fibre muscolari è favorita la dissociazione del complesso perchè la concentrazione locale degli acidi grassi è più bassa e perchè gli acidi grassi tendono a diffondere nelle fibre che li utilizzano a fini energetici. E' improbabile che gli acidi grassi ritornino indietro perchè nelle fibre vengono metabolizzati (convertiti in acil-CoA).

L'abbassamento della concentrazione degli acidi grassi è un fattore importante per promuovere la dissociazione dei complessi albumina-acido grasso, la quale tende a normalizzare la concentrazione degli acidi grassi liberi. Può apparire un paradosso che l'abbassamento della concentrazione degli acidi grassi nelle cellule (che è comunque di piccola entità), favorisca l'utilizzazione degli stessi nelle stesse cellule. Tuttavia bisogna considerare che la concentrazione degli acidi grassi liberi nel sangue e così nelle cellule, è allo stato stazionario (Css), e che non è solo importante la concentrazione, quanto il flusso degli acidi grassi che dal sangue entrano nella cellula. Se la C_{ss-AG} liberi nel sangue è maggiore che nelle cellule (gradiente di concentrazione), gli acidi grassi fluiscono all'interno delle cellule, riducendo la loro C_{ss} nel sangue; ciò sarebbe permanente se non ci fossero nel sangue complessi albumina-acido grasso che dissociandosi riportano al valore normale la C_{ss-AG} . Se la cellula riduce o cessa l'utilizzazione degli acidi grassi, questi aumenteranno la loro C_{ss} nella cellula, rifluendo poi dalla cellula verso il sangue, opponendosi così al flusso degli AG nel sangue verso la cellula stessa. In questo modo la C_{ss-AG} liberi nei capillari non varierà e non si avrà diminuzione della C_{ss} dei complessi Al-AG.

b) Lo schema mostra lo stesso meccanismo di trasporto indicato in a), con la differenza che in a), per semplicità, sono indicate le reazioni di associazione e dissociazione di singole molecole e complessi, mentre in b) si vuol mostrare che nella realtà, la formazione di complessi albumina-acido grasso avviene per l'incontro nel sangue di molte molecole di albumina ed acidi grassi. Le molecole di albumina libere, quando passano in un capillare che irrori il tessuto adiposo, associano l'acido grasso formando con esso il

complesso; con il passare in un distretto dove la concentrazione degli acidi grassi è inferiore, i complessi si dissociano e l'albumina libera continua a circolare nel sangue, e quando riattraverserà i capillari del tessuto adiposo, si ricaricherà nuovamente e così via, fino a che tutti i distretti ematici avranno la stessa concentrazione di acidi grassi liberi.

c) Sono indicate schematicamente concentrazioni relative di albumina libera e di complesso albumina-acido grasso nel sangue, prima di attraversare il tessuto adiposo, nel tessuto adiposo e nel tessuto muscolare nelle prime fasi di trasporto.

Dopo vari cicli di circolazione le variazioni indicate si riducono a favore di un'alta concentrazione di acidi grassi liberi e di complessi Al-AG, in relazione all'utilizzazione degli acidi grassi da parte dell'organismo e fino a quando gli acidi grassi sono liberati in grande quantità dagli adipociti. Se il flusso di acidi grassi dagli adipociti nel sangue sarà ridotto, anche la concentrazione di acidi grassi e complessi diminuirà in relazione all'utilizzazione degli acidi grassi da parte dei tessuti.

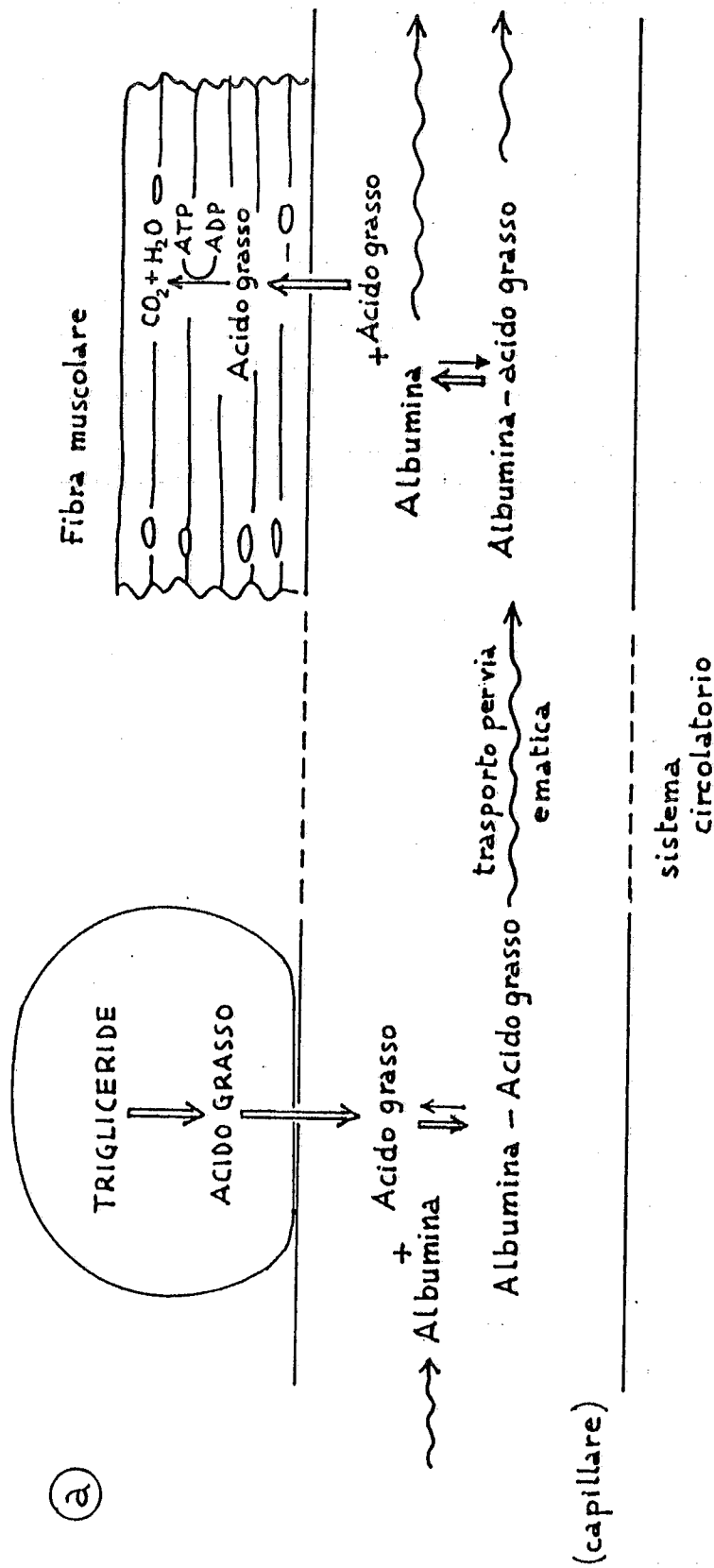


Fig. 6-2

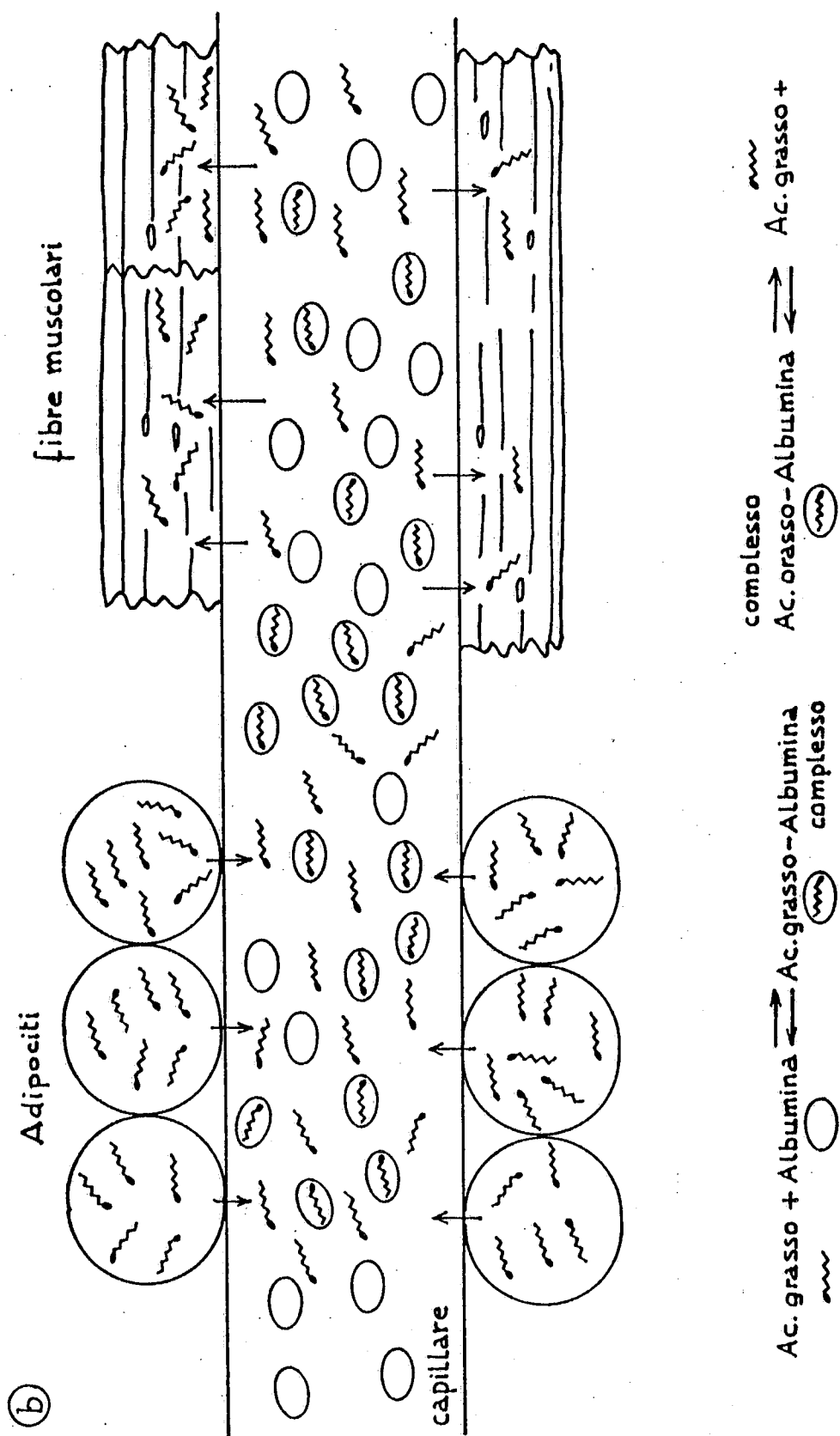


Fig. 6-2

Fig: 6-2

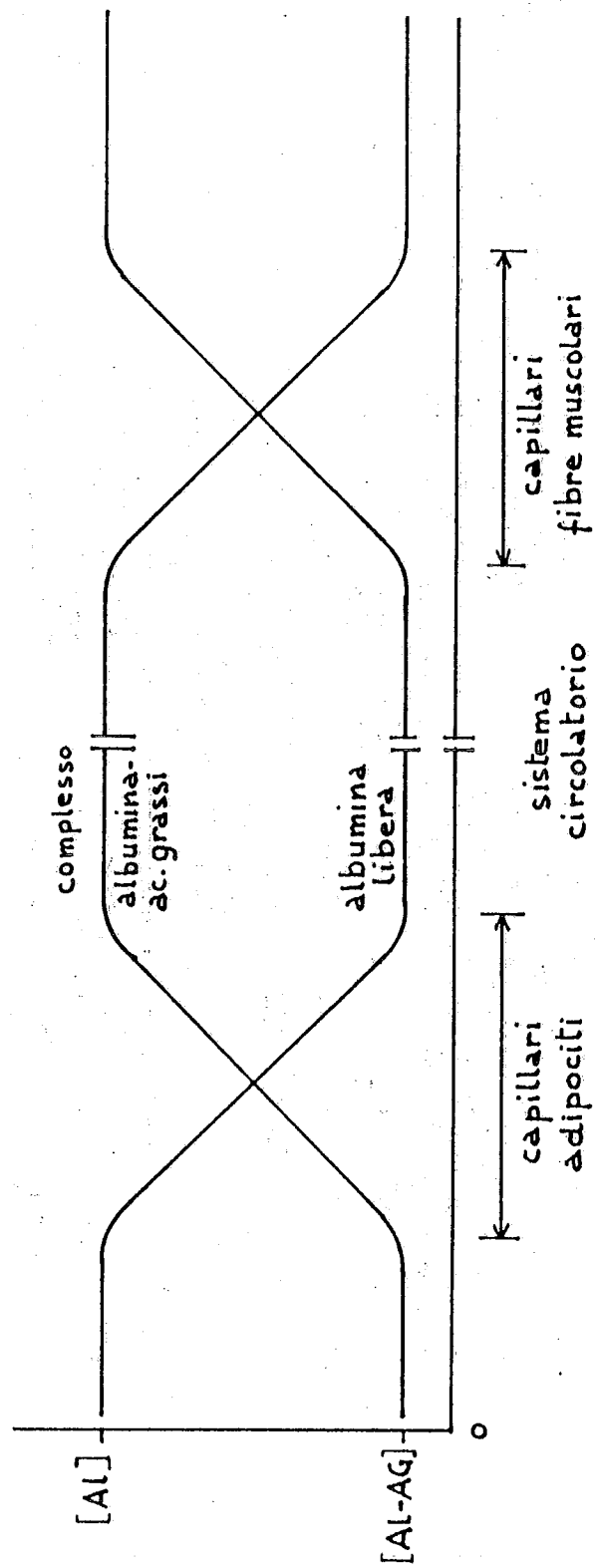


Fig. 6-3

Struttura dell'emoglobina (da Dickerson e Geis, Hemoglobin, Benjamin, Menlo Park, Va., USA, 1983. Ridisegnato e modificato parzialmente).

- a) Struttura terziaria di una subunità β della Hb. E' indicata la disposizione del polipeptide (α elica e ripiegamenti) senza residui aminoacidici.
- b) Struttura quaternaria dell'Hb. Sono indicate le parti in α elica ed i ripiegamenti di una subunità α ed una subunità β . Le altre due subunità (α_2 e β_1) sono disposte come α_1 e β_2 e per semplicità sono stati indicati solo i loro contorni.
- c) Modello "spaziale" dell'Hb. Le aree scure delle subunità α_1 e β_2 sono parti dei gruppi eme sulla superficie delle subunità.

a

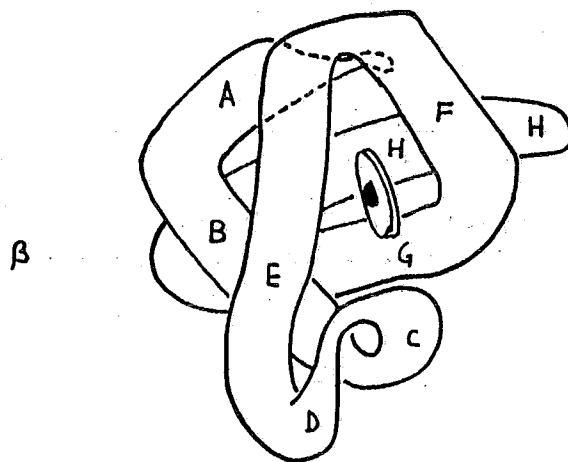
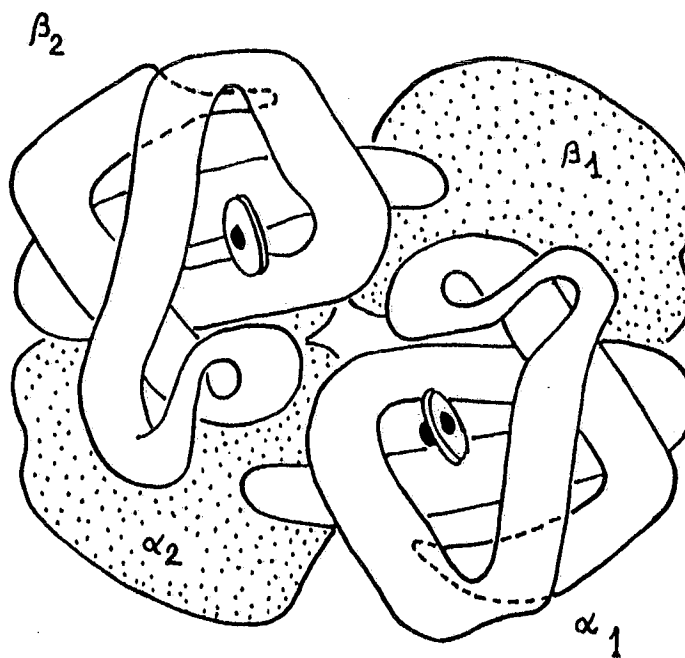


Fig. 6-3

b



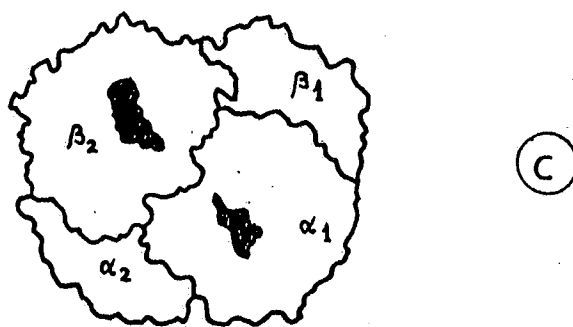


Fig. 6-3

Fig. 6-4

Curva di saturazione della Mb e dell'Hb.

Mb ed Hb sono saturate alle pO_2 alveolari con valori vicini al 100%.

Alla pO_2 di 26 mm di Hg, la Hb è saturata al 50% e la Mb più del 90%.

Le pO_2 dei capillari muscolari sono intorno ai valori della pO_2 di 26 mm di Hg.

(Ridisegnato da Scientific American 239, 92, 1978.

Perutz, M.F.).

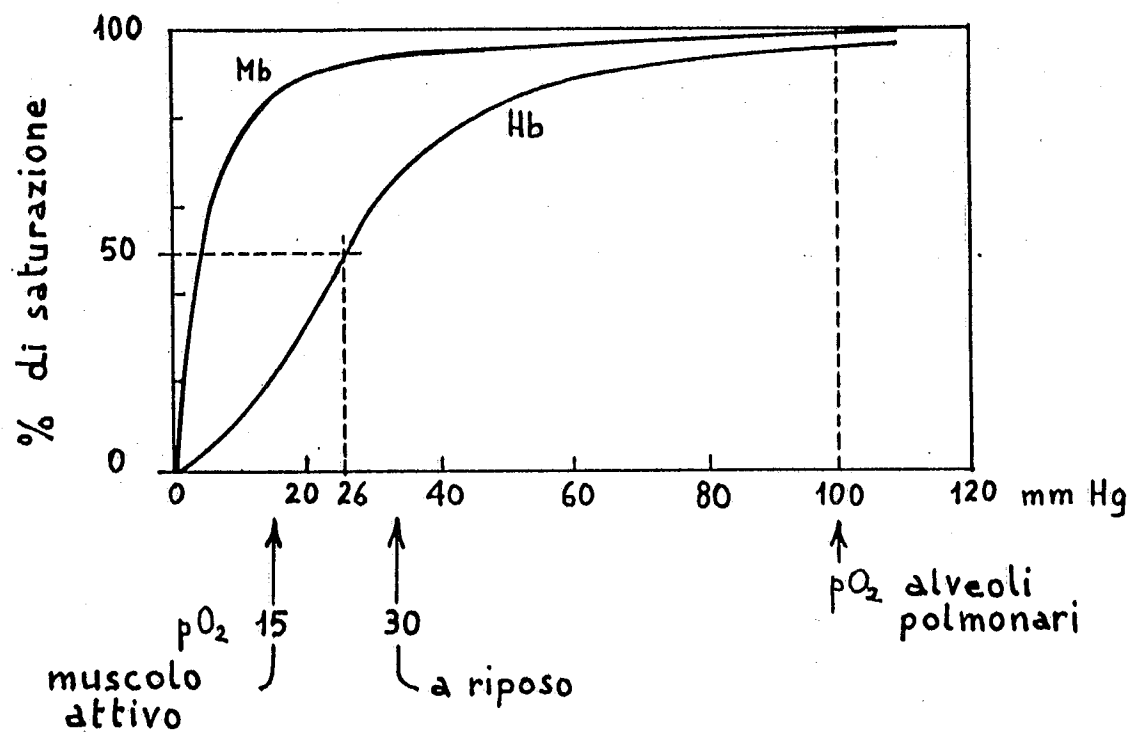


Fig. 6-4

Fig. 6-5

Effetto del pH sulla curva di saturazione da O_2 dell'emoglobina.

a) Sono rappresentate le curve di saturazione a tre differenti valori di pH.

pH 7,6 del sangue a livello dei polmoni (P).

pH 7,2 del sangue a livello dei tessuti (T).

(Ridisegnato da Principles of Biochemistry, Lehninger A.L., 1982, Worth, USA).

b) Con la linea continua è rappresentata la curva di saturazione, assumendo che con il variare della pO_2 , vari in parallelo anche il valore del pH. La curva descrive ciò che avviene in vivo: a livello dei capillari dei tessuti, dove la pO_2 è bassa, si ha anche un basso valore di pH, a livello dei polmoni, dove la pO_2 è alta, anche il valore del pH è relativamente alto.

L'effetto del pH rende la curva più sigmoide, indicando che l'abbassamento del pH favorisce la dissociazione dell'Hb.

(Ridisegnato da Gli Enzimi, Gabrielli F., Piccin Ed., 1979, Padova).

a

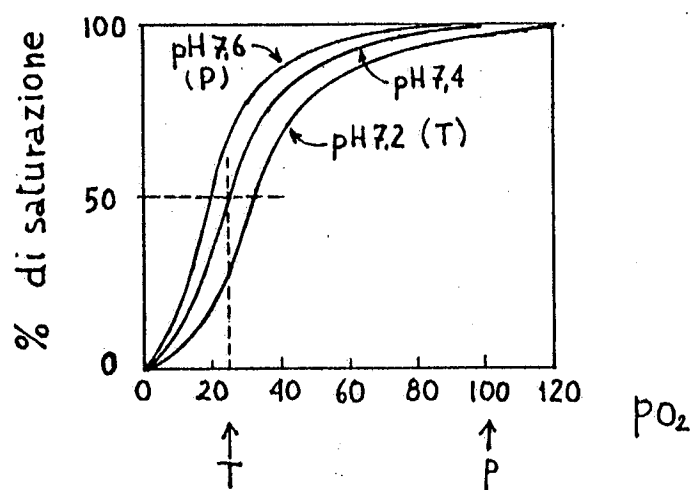


Fig. 6-5

b

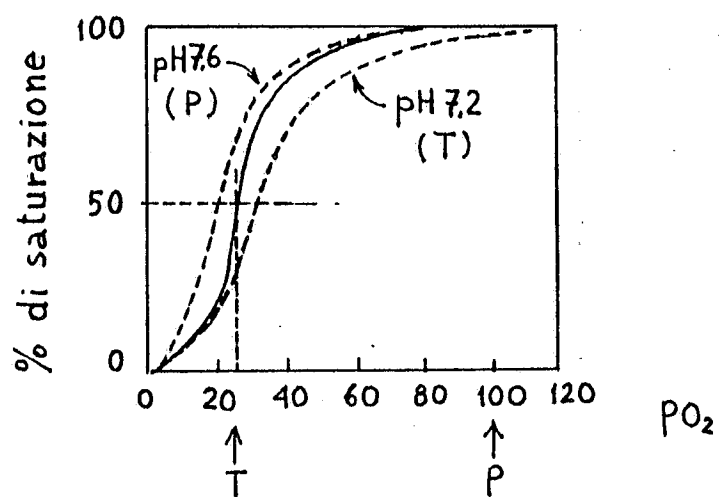
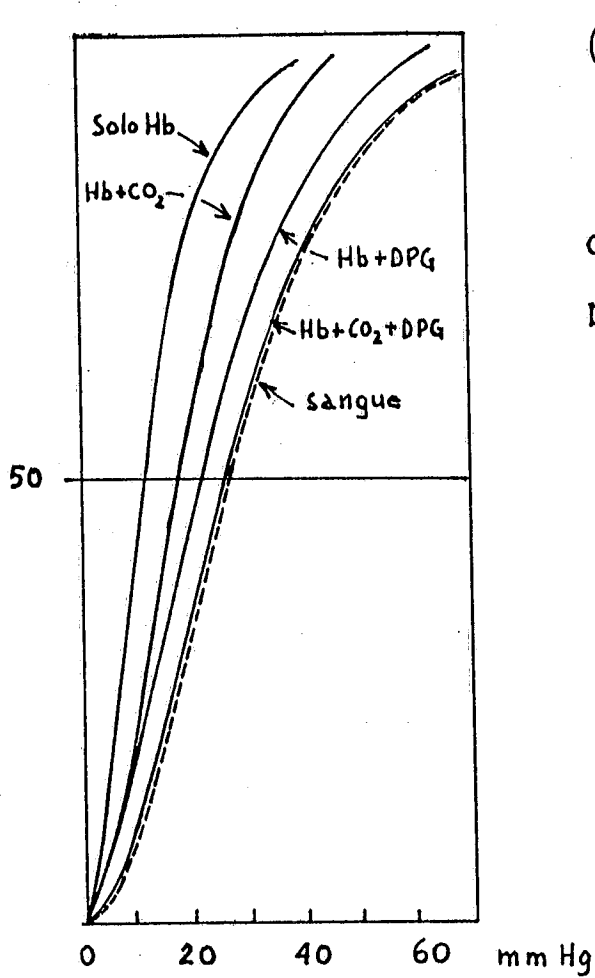


Fig. 6-6

Curve di ossigenazione dell'emoglobina in varie condizioni.

- a) Hb in assenza di DPG e CO_2 ; Hb + CO_2 ($\text{pCO}_2 = 40$ mm di Hg); Hb + DPG (1,2 moli di DPG/1 di mole Hb); Hb + CO_2 + DPG e curva di ossigenazione del sangue intero a pH 7,22 (da Hemoglobin, Dickerson R.E. e Geis I., 1983. Benjamin/Cummings, USA, ridisegnato).
- b) Hb senza DPG, in condizioni normali (5 mM DPG) ed in condizioni di ipossia (8 mM DPG) (da Principles of Biochemistry, Lehninger A.L., 1982, Worth, N.Y., USA, ridisegnato).



CO₂ 40 mm Hg

DPG 1,2moli/1mole Hb

Sangue pH 7,22

Fig. 6-6

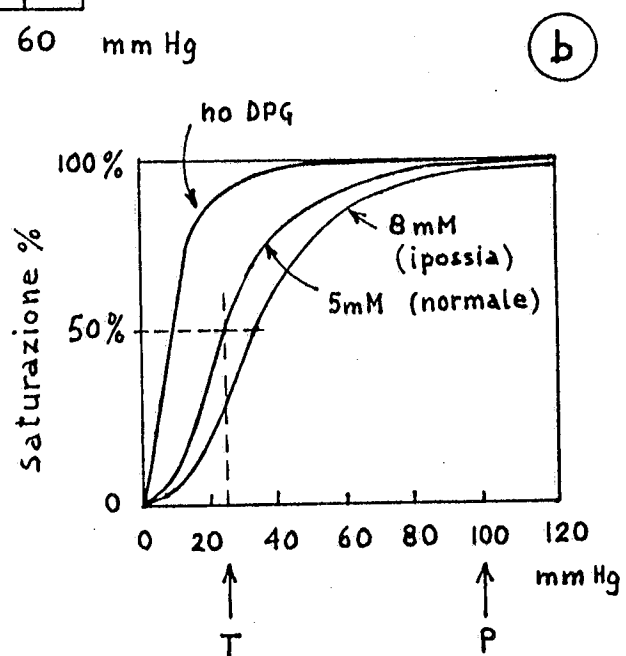


Fig. 6-7

Diagramma delle variazioni delle pressioni parziali di O_2 , CO_2 , e N_2 nell'aria, negli alveoli polmonari e nel sistema circolatorio (da W.F. Ganon, Review of Medical Physiology, 6th Ed., 1973. Lange, Los Altos, Ca., USA, ridisegnato e modificato).

Lo schema illustra il gradiente di pO_2 dell'aria inspirata fino alle vene. Nelle arterie non c'è caduta di pO_2 perché l' O_2 non diffonde attraverso le loro pareti e l'utilizzazione di O_2 da parte delle cellule costituenti l'arteria non modificano significativamente la pO_2 ematica. La caduta di pO_2 è a livello dei capillari ed è provocata dall'assunzione dell' O_2 da parte delle cellule. Non c'è caduta di pO_2 in conseguenza della caduta di pressione del sangue, come indicato dalla pN_2 che rimane costante dagli alveoli alle vene, perché il gas N_2 non viene utilizzato dalle cellule.

La pCO_2 aumenta nei capillari perché il gas prodotto dalle cellule è rilasciato a livello dei capillari. Gli alveoli contengono una pCO_2 (40 mm Hg) molto più alta di quella dell'aria inspirata (0,3 mm Hg) perché l'aria inspirata si mescola con quella espirata contenente CO_2 . In conseguenza di ciò le arterie hanno una pCO_2 di 40 mm di Hg.

Tra parentesi i valori delle pressioni parziali.

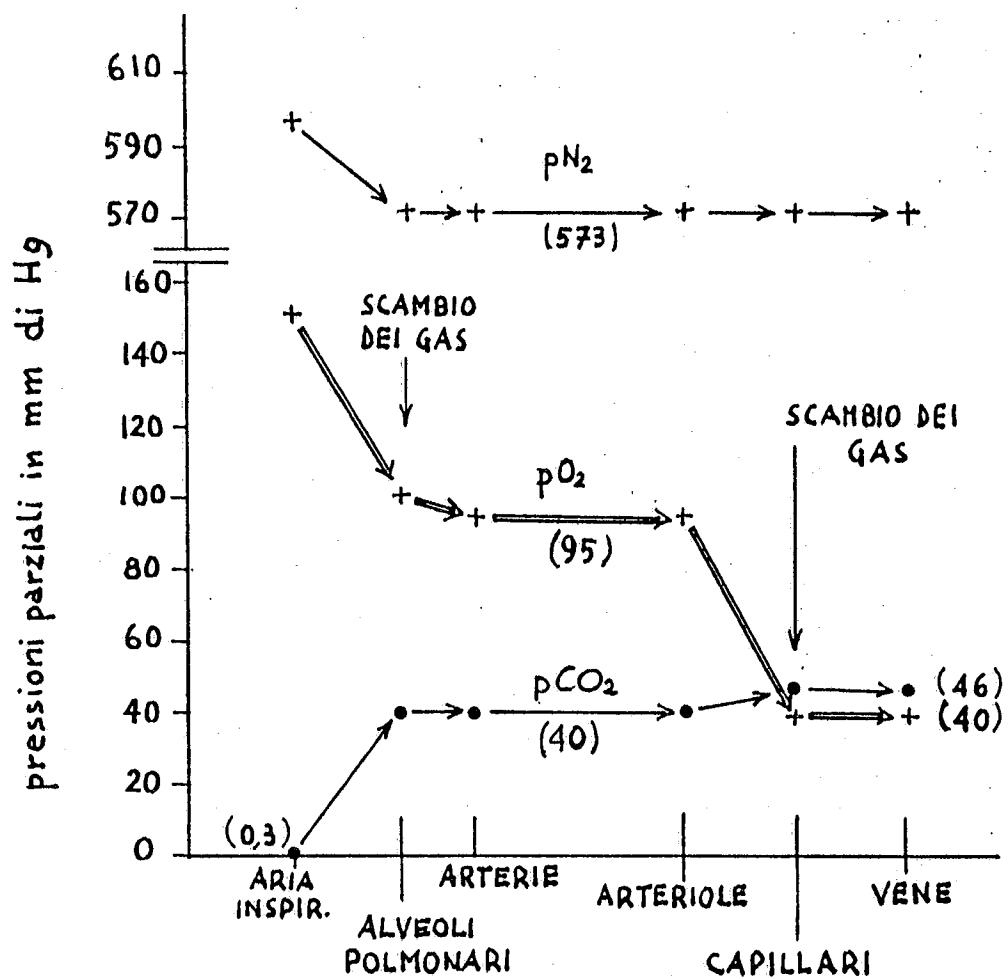


Fig. 6-7

Fig. 6-8

Schema del meccanismo molecolare di ossigenazione dell'emoglobina.

a) Sono indicati i due stati conformazionali quaternari dell'Hb (T ed R) ed i tre stati conformazionali terziari delle subunità (t, t* ed r).

Nel modello proposto le subunità possono cambiare conformazione solo dopo ossigenazione. Il cambiamento di conformazione è diverso in relazione alla conformazione quaternaria dell'Hb. Con Hb-T le subunità passano da t a t*; con Hb-R le subunità passano direttamente da t ad r. Con l'aumentare del numero delle subunità ossigenate diviene più probabile la transizione dell'Hb dalla forma T a quella R. Lo spostamento dell'equilibrio di conformazione tra T ed R è indicato con frecce di diversa lunghezza. In figura si è assunto che la velocità di formazione dei complessi con l'O₂ sia uguale per tutte le subunità α e β quando l'Hb è nella conformazione T ed R. Si è assunto che, quando le due subunità α sono ossigenate, anche se la Hb rimane nella forma T, le subunità β abbiano sufficiente possibilità di movimento da permettere spostamenti della Val E11 e quindi ossigenarsi con $k_{1\alpha} \approx k_{1\beta}$.

Inoltre, si è assunto che nella Hb-T, la velocità di dissociazione dei complessi sia progressivamente più lenta con i valori della k_2 delle subunità in questo ordine: $\alpha_1 < \alpha_2 < \beta_1 < \beta_2$ (vedere testo). Si è assunto che nella Hb-R la velocità di dissociazione dei complessi sia uguale per le subunità α che per quelle β . La velocità di dissociazione di questi complessi risulta inferiore a quelli della Hb-T perchè nell'Hb-R la k_2 risulta circa 50÷100 volte inferiore alla k_2 dei complessi della Hb-T.

Le frecce indicanti gli equilibri delle ossigenazioni delle subunità, sono disegnate con lunghezze diverse per indicare le diverse spontaneità: le frecce verso destra sono tutte uguali (perchè le subunità α si ossigenano per prime), le frecce verso sinistra sono progressivamente più corte nell'Hb-T, uguali nell'Hb-R, più corte nell'Hb-R rispetto all'Hb-T.

Il gioco degli equilibri di ossigenazione e di conformazione favorisce il percorso di ossigenazione indicato in tratteggio. Si ha prima l'ossigenazione delle subunità α ($K_a \approx 2 \cdot 10^4$), la loro ossigenazione sposta l'equilibrio di conformazione dell'Hb da T ad R, e nella nuova conformazione le subunità β hanno una affinità per l'O₂ ($K_a \approx 4 \cdot 10^6$) circa 200 volte maggiore delle α . Con l'ossigenazione delle due subunità α si ha la transizione da T ad R in più del 50% dei casi. Il 100% avviene quando 2,5 subunità sono ossigenate, cioè, quando del rimanente 50%, il 25% delle molecole di Hb è ossigenato su 2 subunità e l'altro su 3. Sono indicati anche i protoni di Bohr ed il DPG come effettori negativi dell'ossigenazione dell'Hb perchè favoriscono la conformazione T della Hb.

b) Reazioni di ossigenazione e conformazionali indicate con simboli letterali. Sono indicate le stesse reazioni indicate nella riquadratura tratteggiata delle schema in a). In questo schema la transizione da T ad R avviene quando le due

subunità α hanno associato O_2 .

c) Reazioni di ossigenazione e conformazionali indicate con simboli letterali come in b). L'Hb-T è stabilizzata da legami salini tra i gruppi α -aminici-terminali delle subunità α (Val α_1) che hanno reagito con CO_2 formando carboamino derivati. Il gruppo carbossilico del carboamino derivato è ionizzato e forma un legame salino con il residuo dell'Arg α_{41} , direttamente, senza ione Cl^- (figg. 6-13e,f; 6-14g,h).

Quando l'Hb è stabilizzata da questo tipo di legame, con l'ossigenazione delle subunità α non si ha liberazione di H^+ (protone di Bohr), invece viene assunto un H^+ per poter liberare la CO_2 . Non si ha liberazione di Cl^- perchè esso non partecipa alla formazione del legame salino formato dai carboamino derivati.

Anche nelle subunità β i carboamino derivati si formano con i gruppi α -amino-terminali. Questi gruppi (a differenza di ciò che avviene nelle subunità α) non formano legami salini che stabilizzano la struttura terziaria, e quindi non sono spezzati con l'ossigenazione. I gruppi amino-terminali delle subunità β interagiscono con il DPG (figg. 6-12, 6-14g). La formazione dei carboamino derivati causa il cambiamento di una carica positiva del gruppo aminico, in una negativa del carbossile. Ciò indebolisce la legatura del complesso Hb-DPG perchè si ha la perdita di 2 legami salini; l'Hb ha quindi per il DPG una affinità minore e comparabile a quella dell'HbF (6-20). Quindi per le subunità β l'assunzione covalente di CO_2 non favorisce la deossigenazione dell'Hb come avviene per le subunità α .

Nelle subunità α , la formazione dei carboamino derivati causa la liberazione di un protone che favorisce la deossigenazione di altre subunità. Quindi con la formazione dei carboamino derivati si ha una azione doppia sulla riduzione dell'affinità dell'Hb: una sulle subunità α che legano covalentemente la CO_2 , l'altra mediata dall' H^+ liberato. Anche nelle subunità β si ha liberazione del protone, tuttavia questa azione è limitata dal fatto che i carboamino derivati riducono l'affinità dell'Hb per il DPG. Circa il 20% della CO_2 è trasportato legato alla Hb come carboamino derivato e si assume che ciò avvenga prevalentemente sulle subunità α .

2

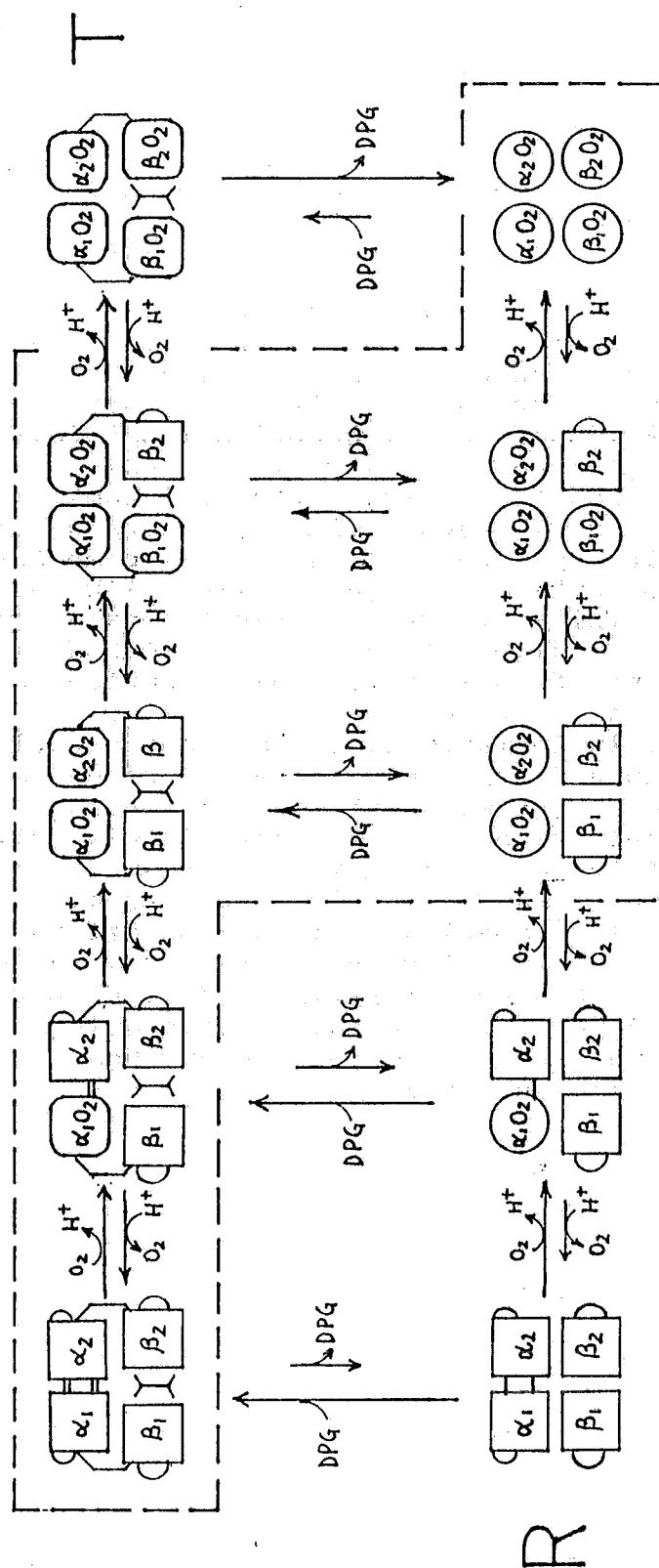


Fig. 6 - 8

(b)

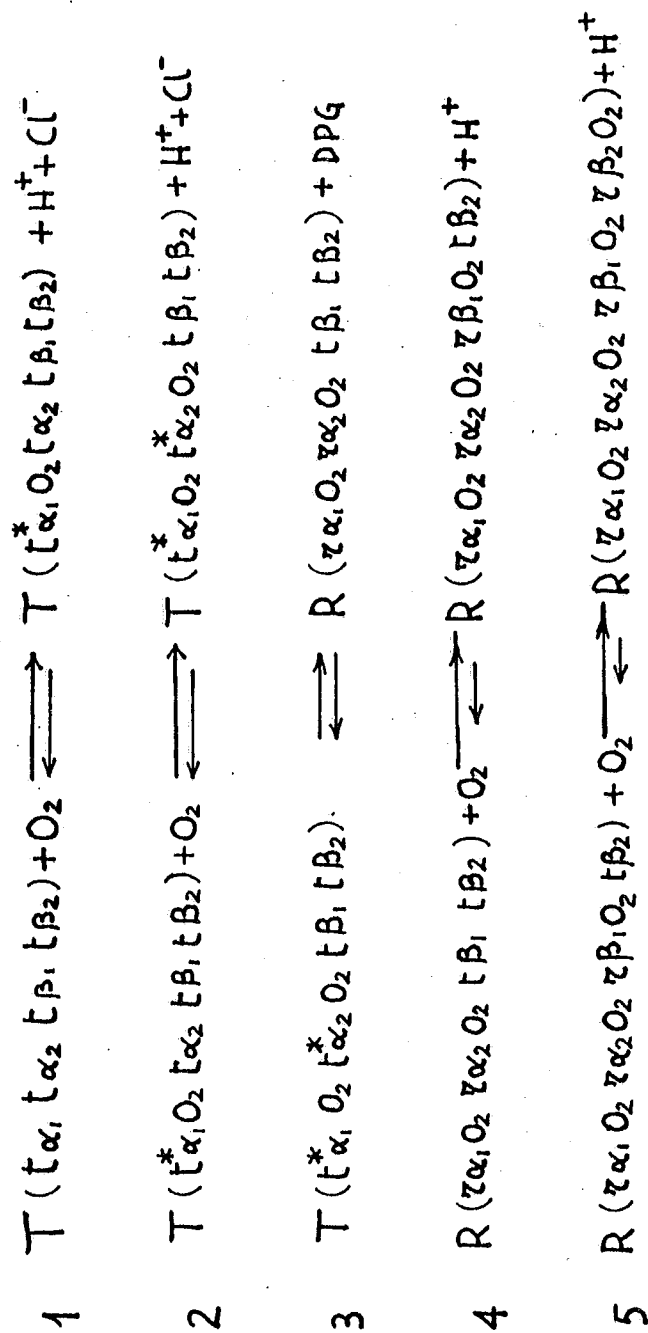


Fig. 6-8

(c)

- 1 $T(t_{\alpha_1} t_{\alpha_2} t_{\beta_1} t_{\beta_2}) + O_2 + H^+ \rightleftharpoons T(t_{\alpha}^* O_2 t_{\alpha_2} t_{\beta_1} t_{\beta_2}) + CO_2$
- 2 $T(t_{\alpha_1}^* O_2 t_{\alpha_2} t_{\beta_1} t_{\beta_2}) + O_2 + H^+ \rightleftharpoons T(t_{\alpha_1}^* O_2 t_{\alpha_2}^* t_{\beta_1} t_{\beta_2}) + CO_2$
- 3 $T(t_{\alpha_1}^* O_2 t_{\alpha_2}^* t_{\beta_1} t_{\beta_2}) \rightleftharpoons R(z_{\alpha_1} O_2 z_{\alpha_2} t_{\beta_1} t_{\beta_2}) + DPG$
- 4 $R(z_{\alpha_1} O z_{\alpha_2} t_{\beta_1} t_{\beta_2}) + O_2 + H^+ \rightleftharpoons R(z_{\alpha_1} O_2 z_{\alpha_2} O_2 z_{\beta_1} t_{\beta_2}) + CO_2 + H^+$
- 5 $R(z_{\alpha_1} O_2 z_{\alpha_2} O_2 z_{\beta_1} O_2 t_{\beta_2}) + O_2 + H^+ \rightleftharpoons R(z_{\alpha_1} O_2 z_{\alpha_2} O_2 z_{\beta_1} O_2 z_{\beta_2} O_2) + CO_2 + H^+$

Fig. 6 - 8

Fig. 6-9

Struttura quaternaria dell'Hb deossigenata (T) e dell'Hb ossigenata (R) (da Hemoglobin, Dickerson R.E. e Geis I, 1983. Benjamin, USA. Ridisegnato e modificato).

Le frecce indicano alcuni degli spostamenti che avvengono tra le due subunità β e tra le subunità α e le β con l'ossigenazione completa e deossigenazione completa dell'Hb (da T ad R).

Il cambiamento più evidente è l'avvicinamento delle due subunità β con riduzione del sito di legame del DPG (vedere fig. 6-12). La freccia tratteggiata indica che lo spostamento delle subunità β avviene per avvicinamento e slittamento di circa 15° (vedere fig. 6-10).

Le linee tratteggiate indicano gli spostamenti degli estremi carbossi ed amino terminali (cambiamenti di struttura terziaria). Altri cambiamenti di struttura terziaria sono visibili confrontando le due figure. I numeri dentro i cerchietti indicano i residui aminoacidici che interagiscono col DPG. Nell'Hb-T, il gruppo carbossilico del residuo aminoacidico terminale β_2 (His 146) forma un legame salino con la Lys α_{140} (i numeri dei due residui sono all'interno di esagoni); nell'Hb-T i residui sono vicini, nell'Hb-R sono distanti ed il legame salino non esiste più (vedere testo e figg. 6-11, 6-13, 6-14).

La struttura dell'Hb-R è dedotta da quella del Hb-Met (Fe^{3+}); si ritiene che Hb-R ed Hb-Met abbiano strutture molto simili.

(a)

Hb-deossi T

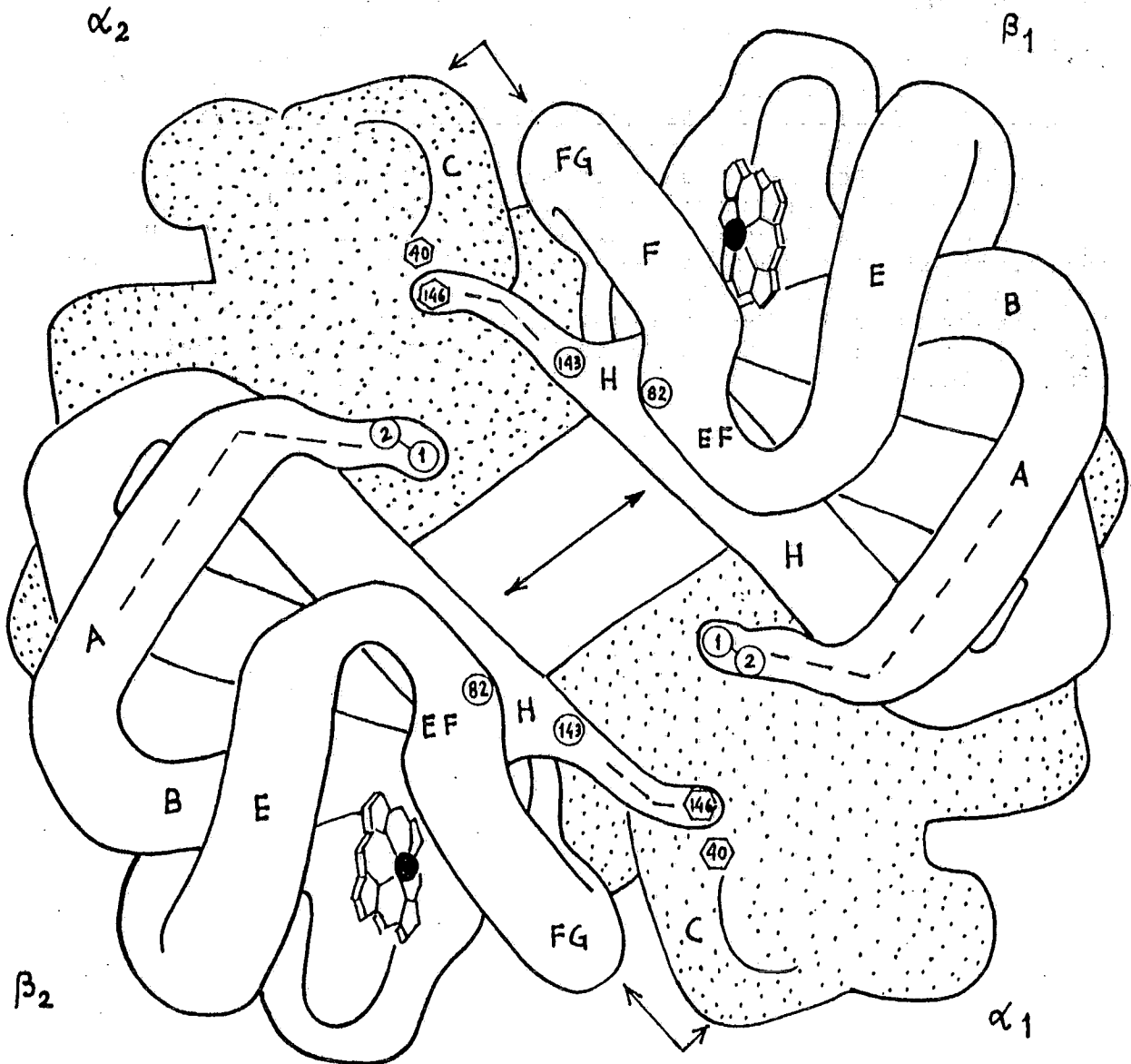


Fig. 6-9

(b)

Hb - ossi R

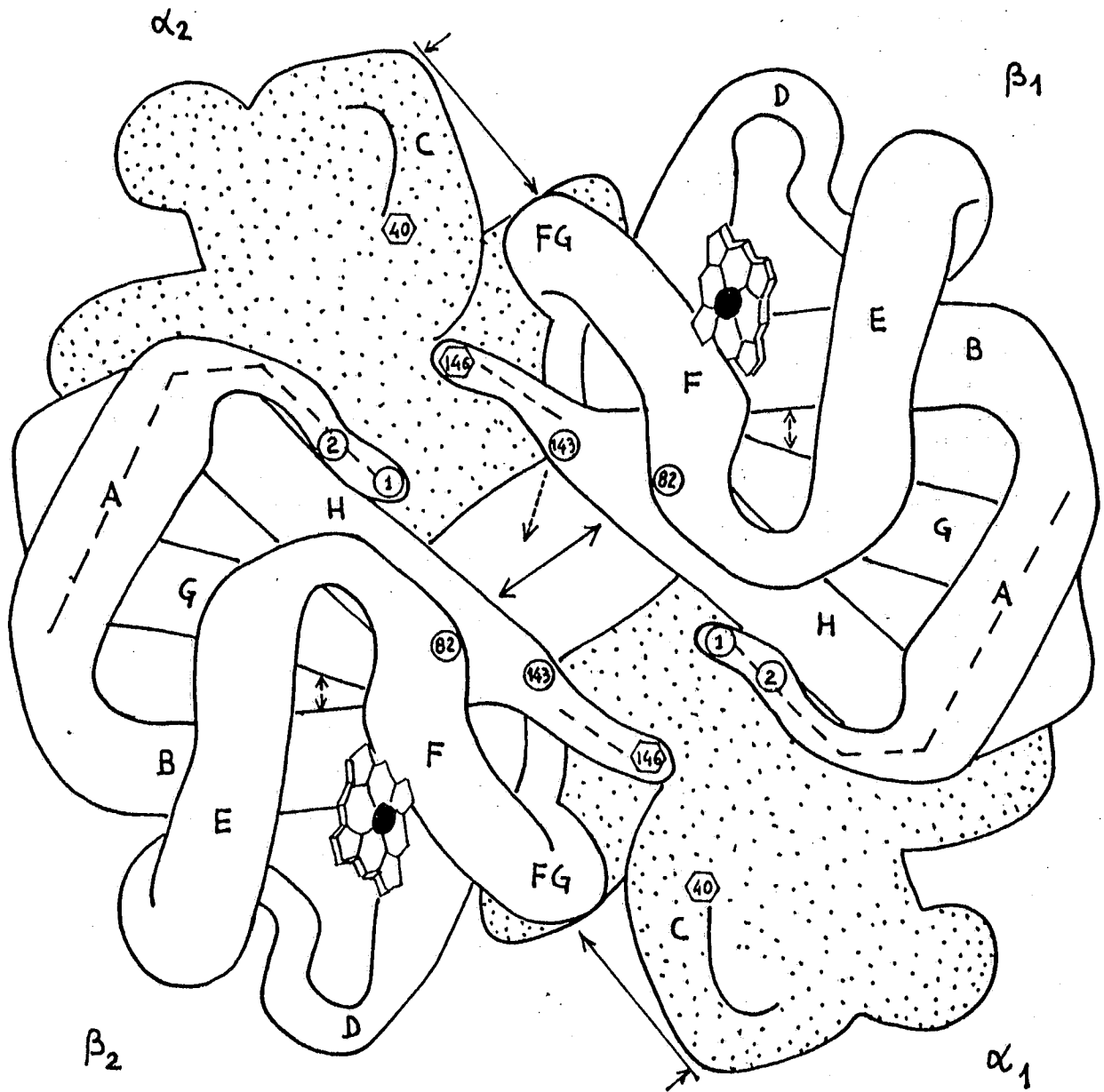


Fig. 6-9

Fig. 6-10

Movimenti delle subunità dell'emoglobina (da Hemoglobin, Dickerson R.E. and Geis I., 1983, Benjamin, USA. Ridisegnato e modificato).

Sono indicati gli spostamenti tra subunità che avvengono con la ossigenazione e deossigenazione dell'Hb (da T ad R e viceversa).

Non sono indicati i cambiamenti di struttura terziaria.

a), b): le figure mostrano che nel cambiamento di conformazione quaternaria le subunità α_1 e β_1 (e così α_2 e β_2) non subiscono spostamenti tra di loro e quindi ciascun dimeri (α_1 - β_1 , e α_2 - β_2) si sposta solidalmente come se fosse un'unica subunità. Con il cambiamento di conformazione quaternaria si ha uno spostamento di circa 15° attorno ad un asse indicato con un punto perchè perpendicolare al piano del foglio), che passa attraverso l'elica H delle due subunità α . Quindi le subunità α hanno tra loro spostamenti relativamente più piccoli di quelli riscontrati tra le due subunità β . In b si osserva lo spostamento di 15° relativo tra i due dimeri e non l'avvicinamento frontale che è osservabile nella fig. 6-9.

Le frecce mostrano gli spostamenti tra le eliche C α_1 ed il ripiegamento FG β_2 . I punti che si spostano sono indicati con +. La zona di interazione tra C α_1 e FG β_2 è detta di spostamento (vedere i).

I residui aminoacidici di queste parti formano legami deboli ed hanno contatti tra loro. Queste interazioni sono importanti per il meccanismo della cooperatività dell'Hb e vengono modificate con il cambiamento di struttura quaternaria da HbT ad HbR e viceversa (fig. 6-11).

c), d): le figure mostrano gli spostamenti tra α_1 e α_2 che avvengono con il cambiamento di conformazione quaternaria dell'Hb. Gli spostamenti maggiori si osservano tra le eliche C che sono le più distanti dall'asse di rotazione, ma i cui residui non interagiscono tra loro. Spostamenti minori avvengono tra le eliche H, e così l'elica H di una subunità ed il gruppo amino terminale dell'altra, i residui aminoacidici dei quali formano legami deboli quaternari coinvolti nel meccanismo cooperativo di associazione dell'O₂.

e), f): le figure mostrano gli spostamenti tra le subunità α_1 e β_2 . Lo spostamento maggiore è tra l'elica C α_1 ed il ripiegamento FG β_2 . Queste parti interagiscono tra loro con punti di contatto e legami deboli (vedere a e b) e la loro regione di interazione è detta di spostamento (fig. i).

Minore spostamento è tra α_1 FG e β_2 C, la loro regione di contatto è detta "giuntura flessibile" (fig. i).

g), h): le figure mostrano gli spostamenti tra le subunità β_1 . Le eliche H, i ripiegamenti EF e le parti amino terminali, subiscono il maggior spostamento, essendo le più distanti dall'asse di rotazione. Residui di queste parti delle due subunità β formano il sito di legame del DPG (vedere fig. 6-12). Il sito di legame del DPG viene ridotto di dimensioni con il cambiamento di conformazione dell'Hb da T ad R (vedere anche fig. 6-9).

i): la figura mostra le zone di interazione tra le subunità

α_1 e β_2 .

La zona tra α_1 FG e β_2 C (indicato con + +) è detta "giuntura flessibile".

La zona tra α_1 FG e β_2 FG (indicato con --->) è detta α_1 , FG, β_2 "di spostamento". Con la transizione da T ad R si hanno piccoli spostamenti nella "giuntura flessibile" e relativamente grandi spostamenti nella zona di "spostamento" (vedere a-h e fig. 6-11).

Sommario (figg. 6-9, 6-10).

Nella transizione dalla conformazione T a quella R dell'Hb si hanno:

- spostamenti tra superfici vicine di subunità diverse. Le funzioni di questi spostamenti sono diverse in relazione alle zone interessate.
- gli spostamenti tra β_1 e β_2 che portano a variazioni nel sito di legame del DPG. Quindi T ed R hanno affinità diverse per il DPG, rispettivamente alta T e bassa R. Quindi il DPG favorisce la conformazione T.
- gli spostamenti tra α_1 e β_2 che portano alla rottura di legami deboli ed alla rimozione di contatti tra β FG ed α C. Questi spostamenti rendono le subunità α e β più libere di cambiare conformazione, e quindi le rendono più affini all'O₂.

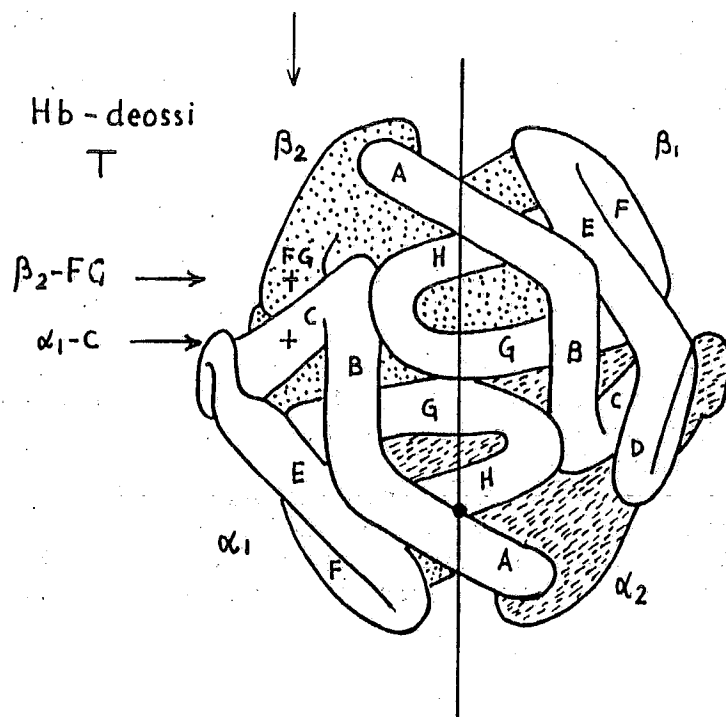
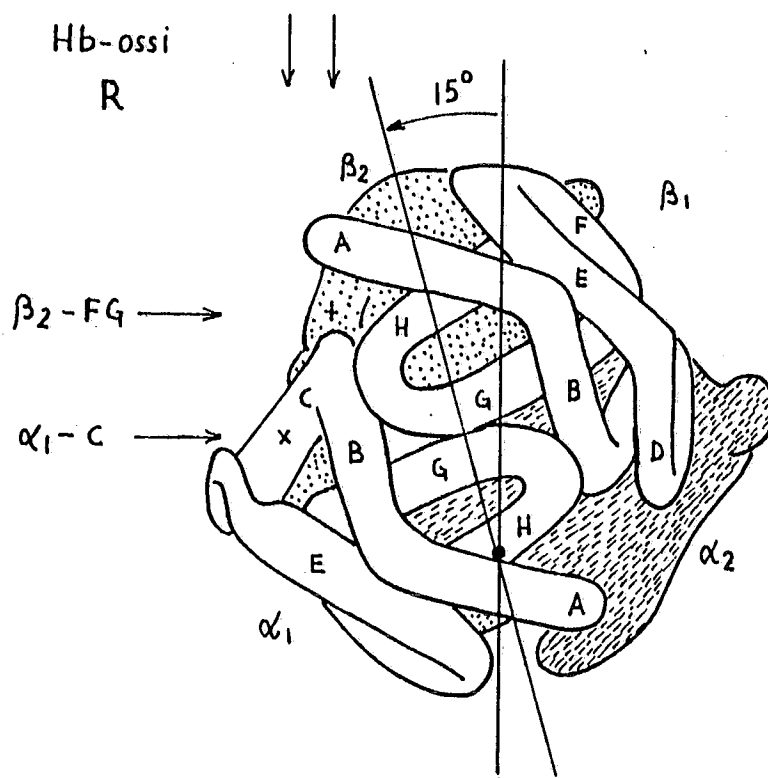


Fig. 6-10



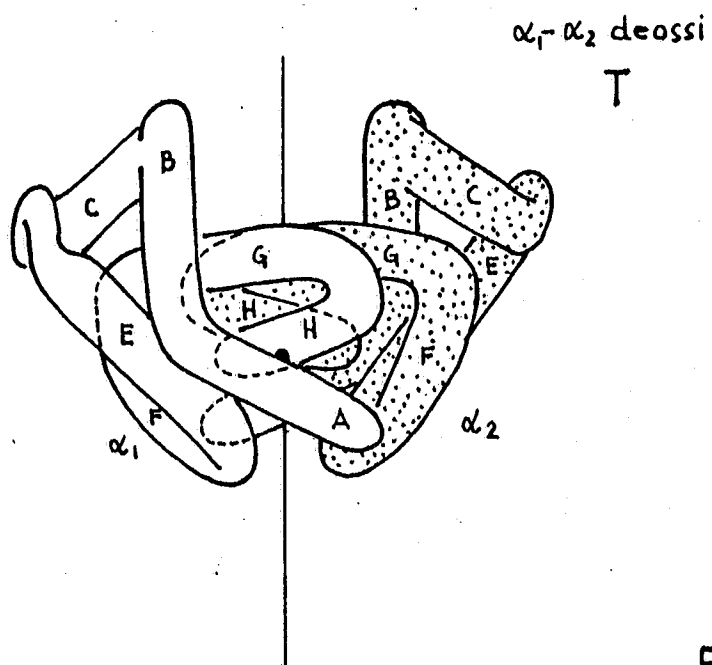
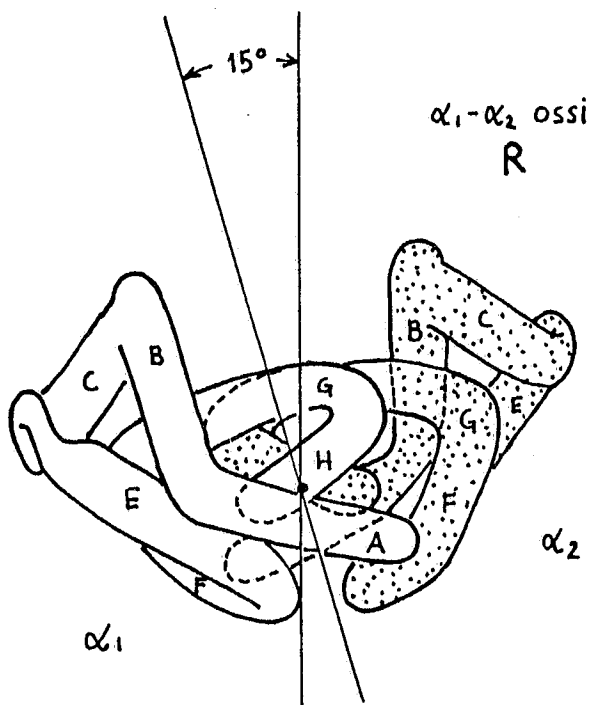
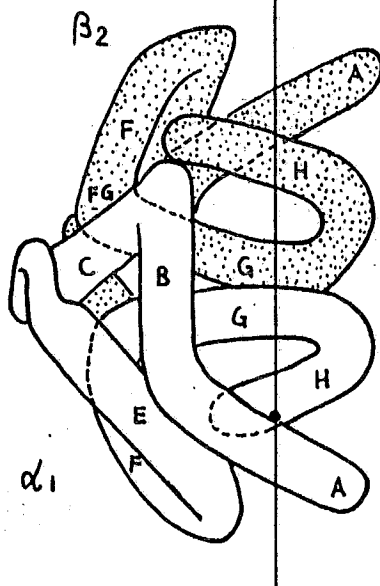


Fig. 6-10



$\alpha_1 - \beta_2$ - deossi

T

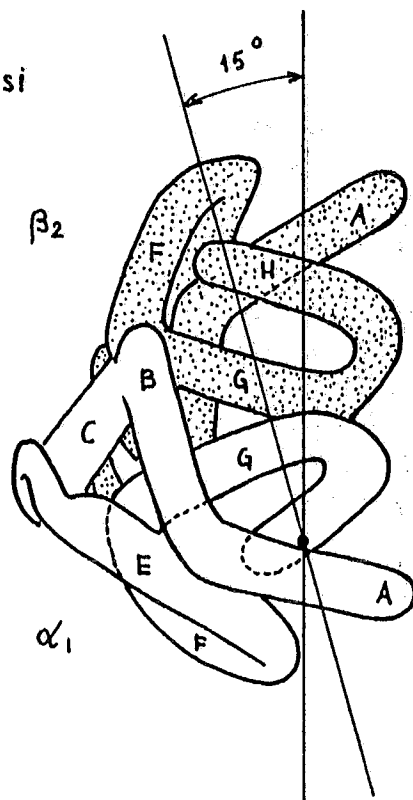


(e)

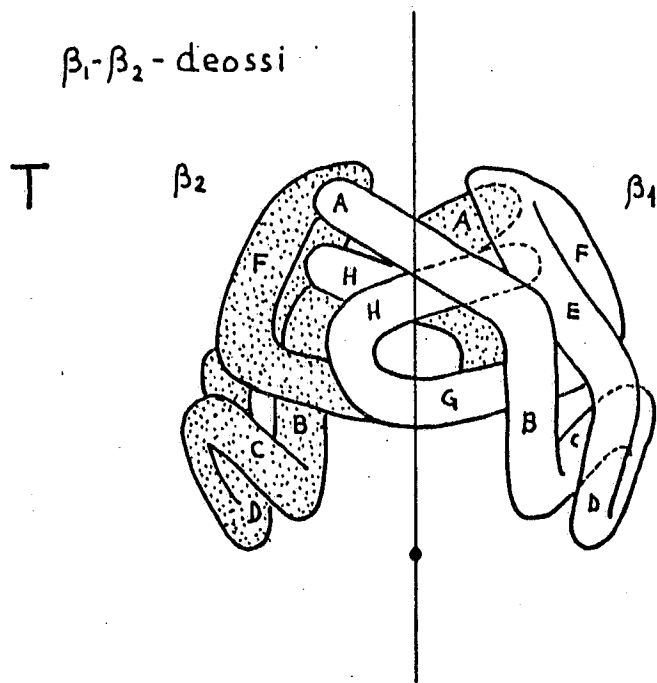
Fig. 6-10

$\alpha_1 - \beta_2$ - ossi

R

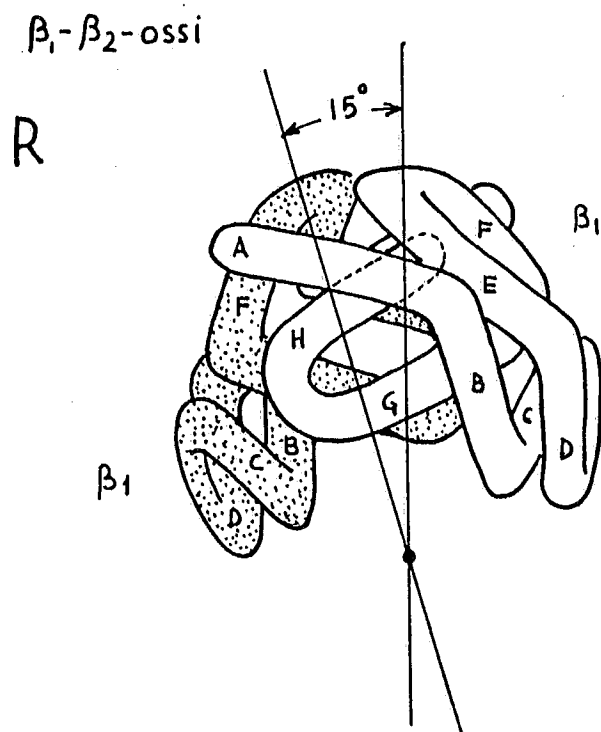


(f)



8

Fig. 6-10



h

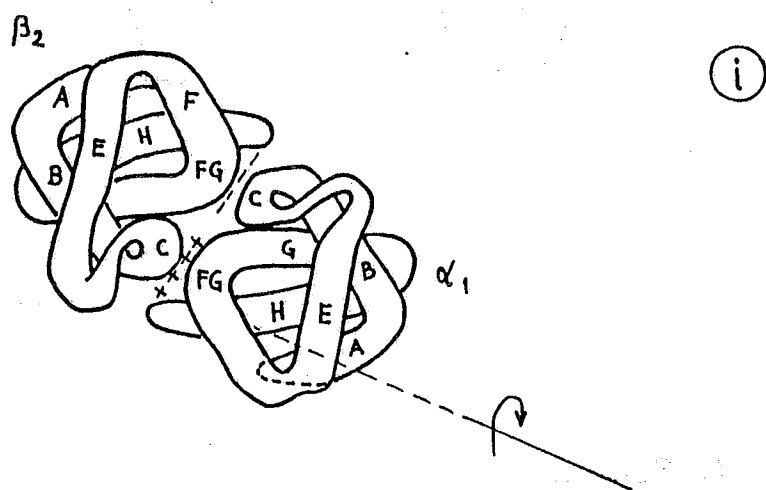


Fig. 6-10

Fig. 6-11

Interazioni tra le eliche C ed i ripiegamenti FG delle subunità α_1 e β_2 (da Hemoglobin, Dickerson R.E., Geis I., 1983, Benjamin, USA. Ridisegnato e modificato).

La figura mostra i cambiamenti di interazione tra elica C e ripiegamenti FG (regione di spostamento e giuntura flessibile) che avvengono con i cambiamenti di struttura quaternaria dell'Hb.

a) Hb deossigenata (T); b) Hb nella conformazione R con tutte le subunità ossigenate.

Sono indicati i legami deboli (---) ed i punti di contatto (°°°) che sono coinvolti nel meccanismo di associazione cooperativo dell'O₂ da parte dell'Hb, che sono eliminati e che si formano nei cambiamenti di conformazione quaternaria da Hb-T a Hb-R.

I punti di contatto che permangono nelle due conformazioni sono indicati con (== == ==).

Non è indicata la sequenza dei cambiamenti di conformazione e dei relativi cambiamenti di interazioni terziaria e quaternaria che sono rispettivamente indicati nelle figg. 6-8 e 6-14.

Hb-deossi
T

(a)

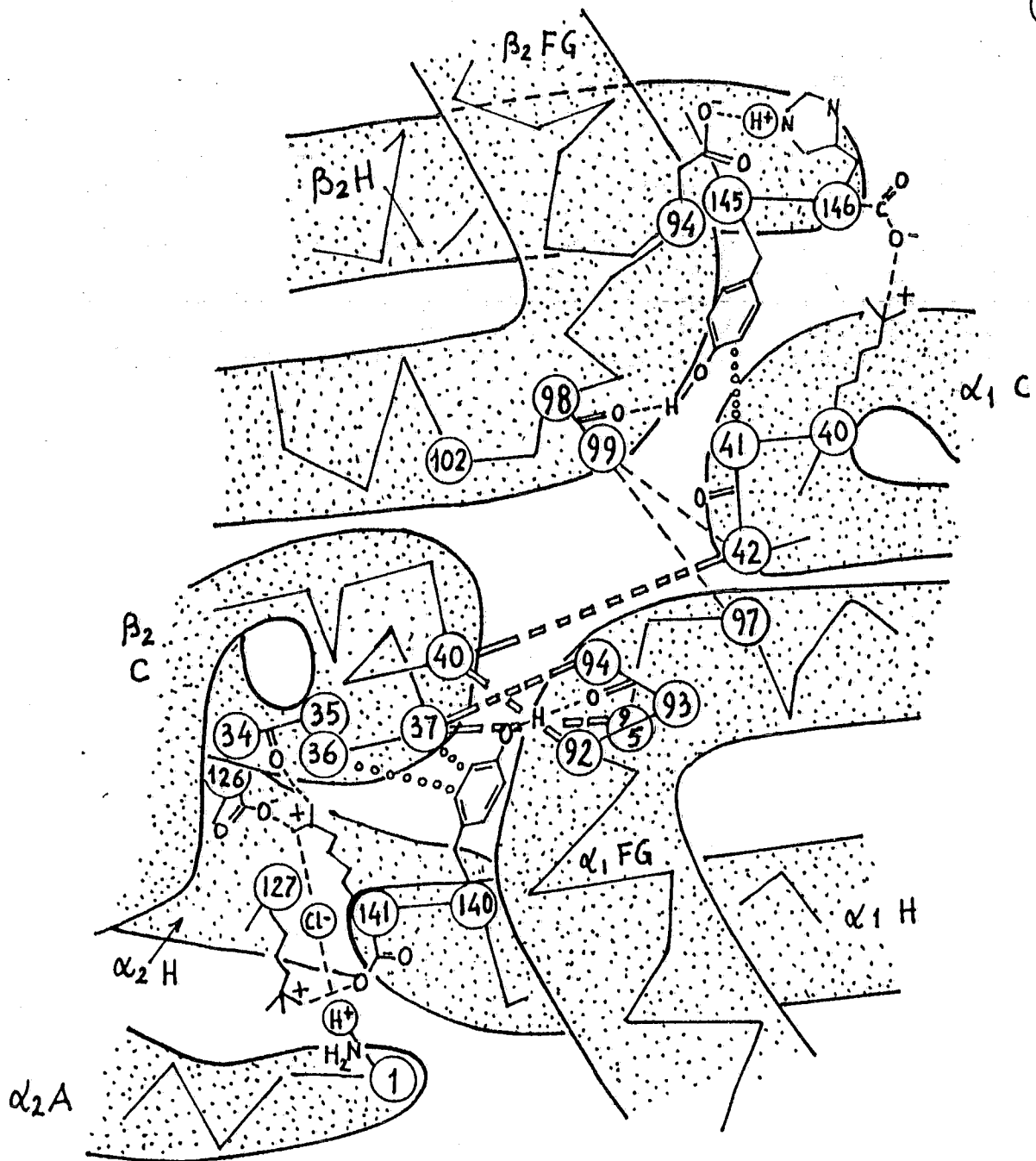


Fig. 6-11

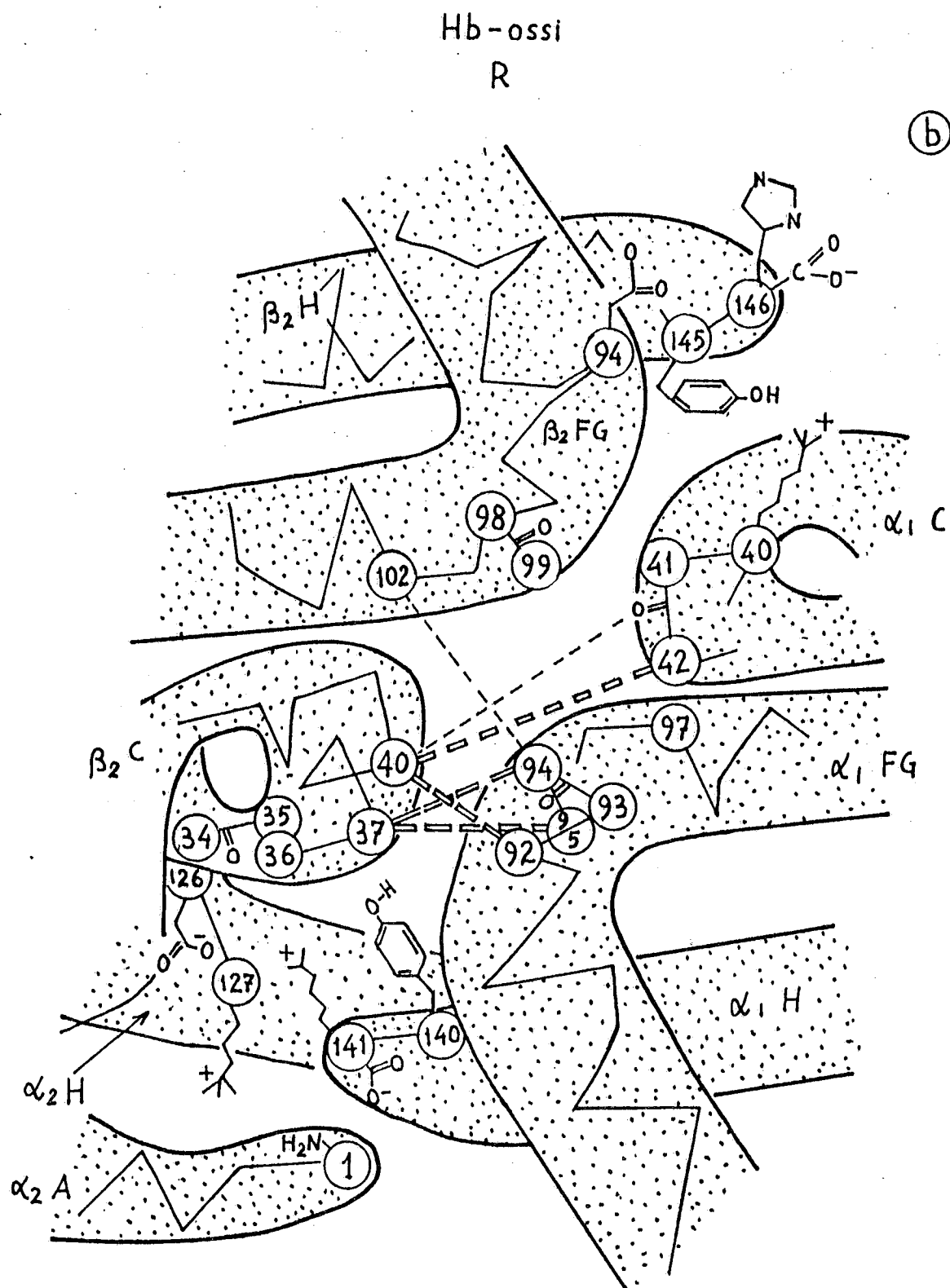


Fig. 6-11

Fig. 6-12

Sito di legame dell'acido 2,3 difosfo-glicerico (DPG) (da Hemoglobin, Dickerson R.E. e Geis I., 1983, Benjamin, USA. Ridisegnato e modificato).

La figura mostra il sito di legame del DPG. Il sito è formato da 6 residui aminoacidici e due gruppi amino terminali delle subunità β . Il DPG forma solo 7 legami a H-salini con gli otto gruppi carichi positivamente, perché la struttura della sua molecola gli permette di interagire con il residuo di Lys 82 di una sola subunità β . Data la simmetria del sito di legame, il DPG può interagire ugualmente bene con la Lys 82 di una o dell'altra subunità β , ma non con tutte e due contemporaneamente. La possibilità di poter formare una associazione stabile con due disposizioni diverse, rende il DPG più affine all'Hb per incremento di entropia di attivazione.

In figura è indicata l'interazione con la Lys 82 della subunità β_2 . Le subunità α non partecipano al legame del DPG.

Sono indicati gli atomi di carbonio (94, 145, 146) a cui sono legati i residui aminoacidici delle subunità β che formano legami intrasubunità. Questi legami sono spezzati con il cambiamento di conformazione che le subunità β eseguono con l'ossigenazione.

E' indicato con tratteggio e frecce il legame a H-salino tra il gruppo carbossilico β_2 terminale (146) e la Lys α_{140} . Questo legame quaternario è spezzato con la transizione quaternaria dell'Hb da T ad R (vedere figg. 6-11, 6-13, 6-14). Se l'ossigenazione della β_2 avviene prima della transizione T---->R, il legame viene spezzato o indebolito dal cambiamento di struttura terziaria della subunità β_2 . Analoghe considerazioni possono essere fatte per la subunità β_1 .

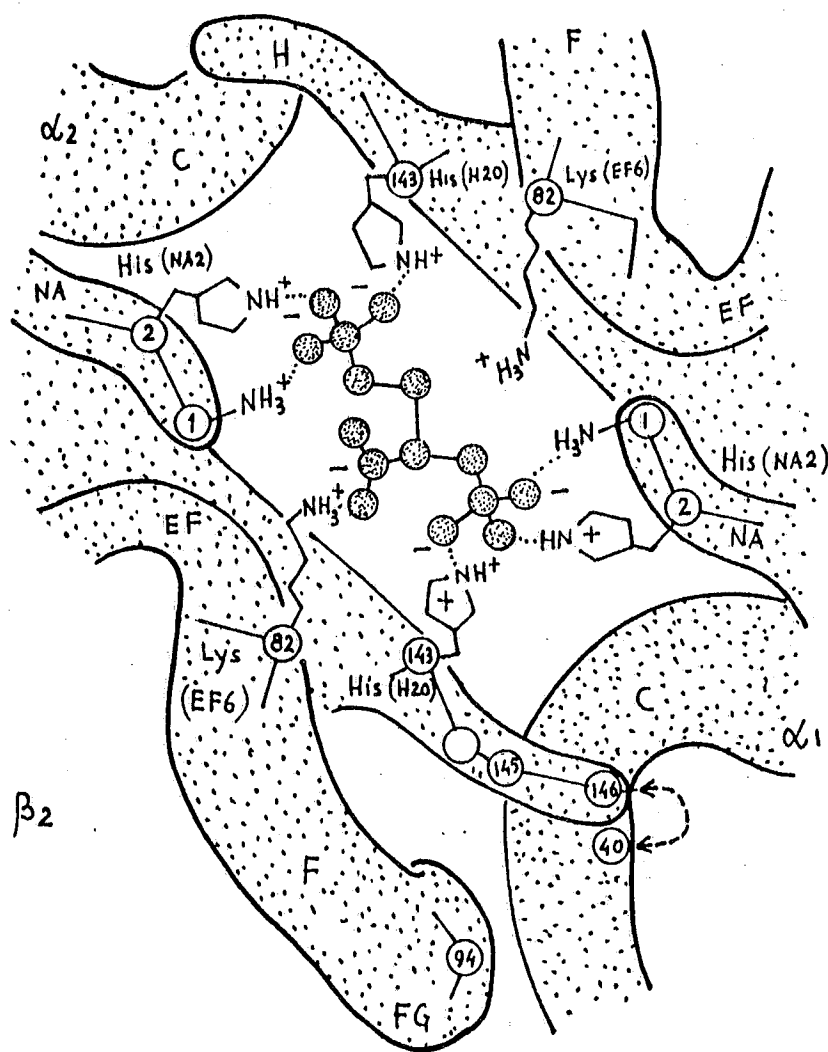


Fig. 6 - 12

Fig. 6-13

Legami salini e legami a idrogeno* tra i residui carbossi-terminali delle subunità α e β della Hb non ossigenata (da Hemoglobin, Dickerson R.E. e Geis I., 1983, Benjamin, USA, ridisegnato e modificato).

* Le analisi per mezzo dei raggi X spesso non permettono di distinguere tra i due tipi di legame.

a) Legami deboli dei residui dei due penultimi aminoacidi (140, 141) della subunità α_1 (la subunità α_2 forma identici legami) con residui della subunità α_1 stessa, e con residui delle subunità α_2 e β_1 .

b) Con l'ossigenazione della subunità α_1 si ha la rottura di tutti i legami indicati in a, e la liberazione del protone di Bohr e del Cl^- . Il protone è ceduto dal residuo aminico terminale della subunità α_2 (cioè quella che non si è ossigenata). Con l'ossigenazione dell' α_1 , si ha la rottura dei legami quaternari (α_1 - β_2 ed α_1 - α_2) e quindi l'indebolimento della struttura T.

Se l'Hb passa da T ad R prima che l' α_1 sia ossigenata, si assume che i legami quaternari (α_1 - β_2 ed α_1 - α_2) siano indeboliti e che qualcuno si spezzi. Tuttavia si ammette che il legame tra Arg 141 α_1 e Val 1 α_2 e tra Tyr 140 α_1 ed il CO della Val 93 α_1 rimangano presenti anche se più deboli, e che siano rotti solo con il cambiamento di struttura terziaria conseguente l'ossigenazione. Identiche

considerazioni sono valide per l'ossigenazione dell' α_2 .

c) Legami deboli dei residui dei due penultimi aminoacidi (145, 146) della subunità β_2 (la subunità β_1 forma identici legami) con i residui della subunità β_2 stessa e con i residui della subunità α_1 .

d) Con l'ossigenazione della subunità β_2 si ha la rottura di tutti i legami indicati in b e la liberazione del protone di Bohr. Il protone è ceduto dal residuo di istidina 146 β_2 (cioè della stessa subunità che si è ossigenata).

L'ossigenazione della β_2 porta alla rottura di un legame quaternario tra il carbossi-terminale (146) e la Lys 40 α_1 , e ciò causa un indebolimento della struttura T dell'Hb. Se l'Hb passa da T ad R prima che la subunità si ossigeni (evento più probabile per le subunità β che per le α), si ritiene che si spezzi il legame quaternario α_1 - β_2 suddetto e ciò faciliti il cambiamento di conformazione terziaria che la subunità β compie in conseguenza della ossigenazione.

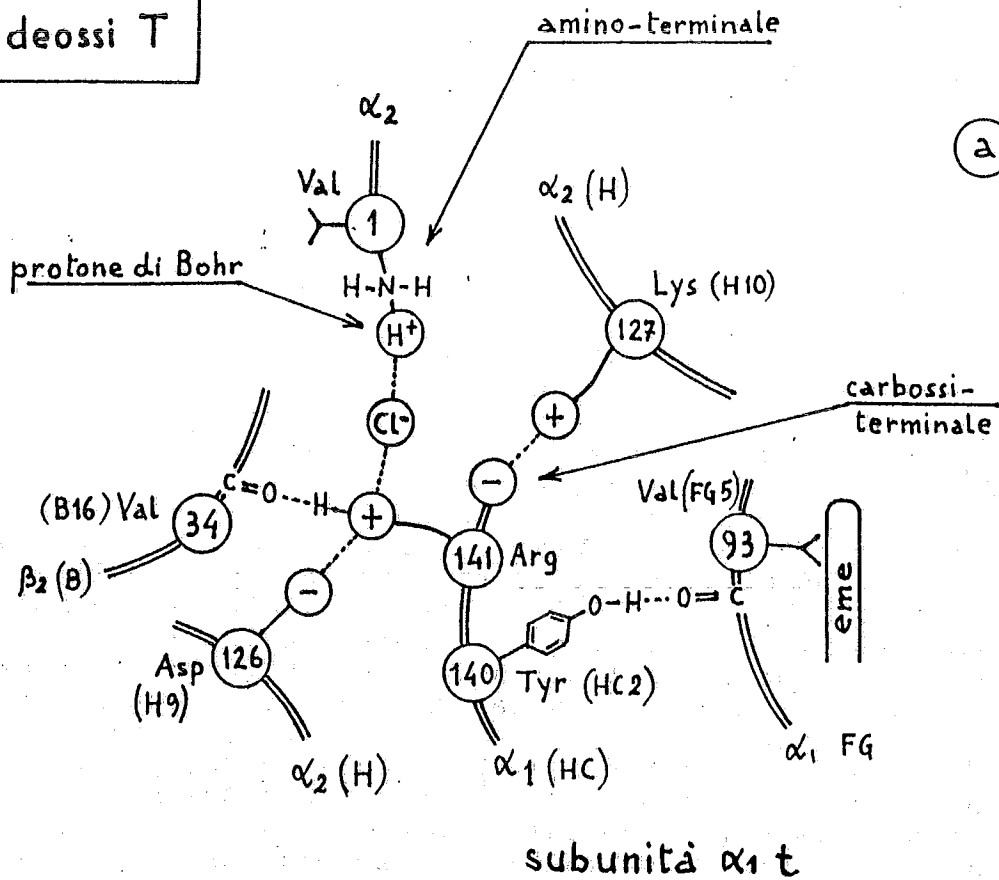
Al pH fisiologici (circa 7,4), il gruppo aminico terminale è all'80% nella forma protonata $-\text{NH}_3^+$ ed il 20% nella forma $-\text{NH}_2$; solo l'11% dell'istidina è protonato. Tuttavia nell'Hb deossi, la carica positiva del $-\text{NH}_2$ terminale (Val 1 α_2) e la carica positiva dell'Ist 146 β_2 , sono stabilizzate rispettivamente dallo ione Cl^- e dal residuo Asp 94 β_2 , per cui nell'Hb deossi sia il gruppo NH_2 -terminale delle α (Val 1) e l'Ist 146 delle β sono al 100% nella forma protonata. Nella Hb ossigenata, l'assenza dei legami suddetti, porta alla liberazione dei protoni di Bohr. Il gruppo NH_2 -terminale di ogni singola subunità α ossigenata sarebbe protonato l'80% del tempo e solo il 20% non protonato. Reagendo con la CO_2 , il gruppo aminico è

indotto a liberare il protone. L'istidina β 146 risulta protonata solo al 20%, quando la subunità β è ossigenata. Se consideriamo un insieme di molecole di Hb ossigenate al 100% in una soluzione, in ogni momento ci sarà il 20% delle subunità β con l'istidina terminale protonata, cioè senza aver rilasciato il protone di Bohr. Essendo l'equilibrio dinamico, le subunità β protonate non saranno mai le stesse. Se nella stessa soluzione tutte le subunità α che hanno legato covalentemente la CO_2 al gruppo amino-terminale, in ogni momento i gruppi amino-terminali deprotonati saranno il 100%, cioè tutte le subunità α avranno perso il protone di Bohr.

e) Legami deboli (a H e salini) dei residui dei due penultimi aminoacidi della subunità α_1 con residui della stessa subunità α_1 e con residui delle subunità α_2 e β_1 . A differenza di quanto visto in a), il legame a H-salino tra la Val 1 α_2 e l'Arg 141 α_1 , è realizzato tramite il carboamino derivato del gruppo amino terminale della Val 1 α_2 . Alla formazione del legame non partecipa il protone di Bohr né lo ione Cl^- (vedere figg. 6-8c, 6-14g). Se il gruppo NH_2 -terminale della subunità α_1 è carbamitato, la subunità α_2 forma legami identici a quelli sopra indicati.

f) Con l'ossigenazione si ha la rottura di tutti i legami salini indicati in e). Si ha la liberazione di una molecola di CO_2 e l'assunzione di un protone che, neutralizzato dall'elettone del carbossile, si lega al N del gruppo amino terminale della Val 1 α (vedere figg. 6-8c e 6-14h). La formazione e la scissione dei carboamino derivati, pur essendo una reazione covalente, non sembra essere catalizzata da enzimi. Si assume che la reazione avvenga velocemente per uno stato di particolare reattività dei gruppi $-\text{NH}_2$ -terminali determinati dai gruppi atomici a loro vicini. In questa ipotesi l'ambiente vicino ai gruppi NH_2 -terminali corrisponde a quello di un sito di catalisi di un enzima. Per la carbamitazione dei gruppi $-\text{NH}_2$ terminali delle subunità β , vedere fig. 6-14g ed h.

Hb-deossi T



Hb-ossi R

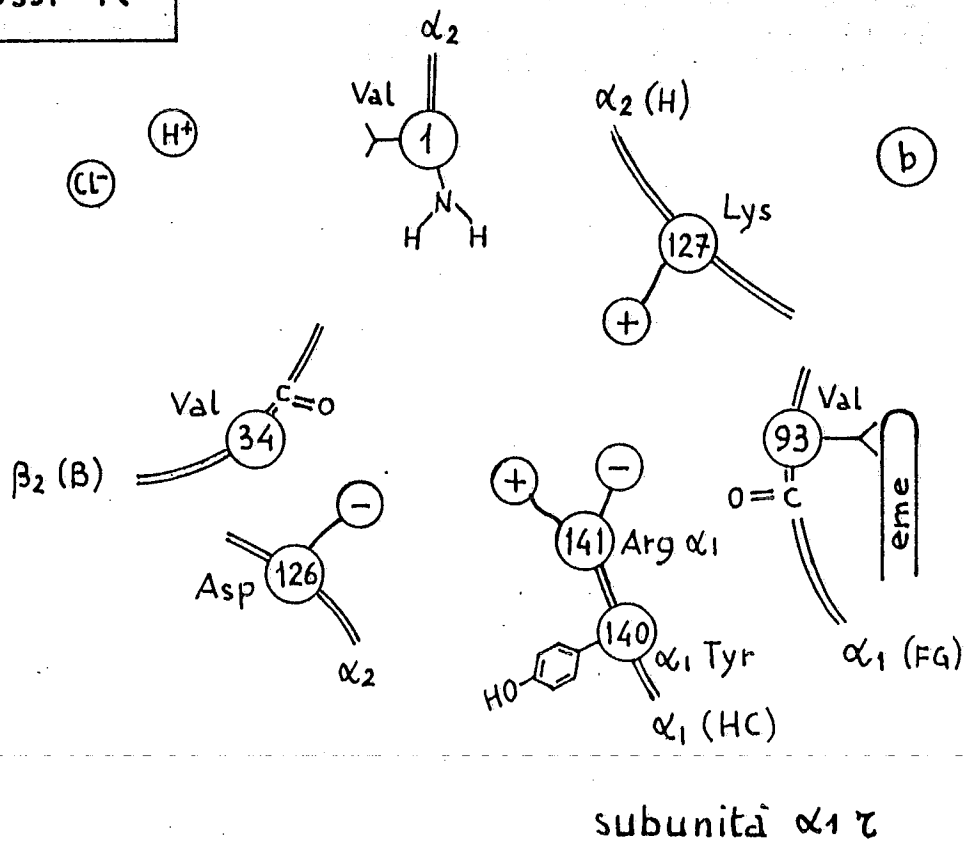


Fig.6-13

Hb-deossi T

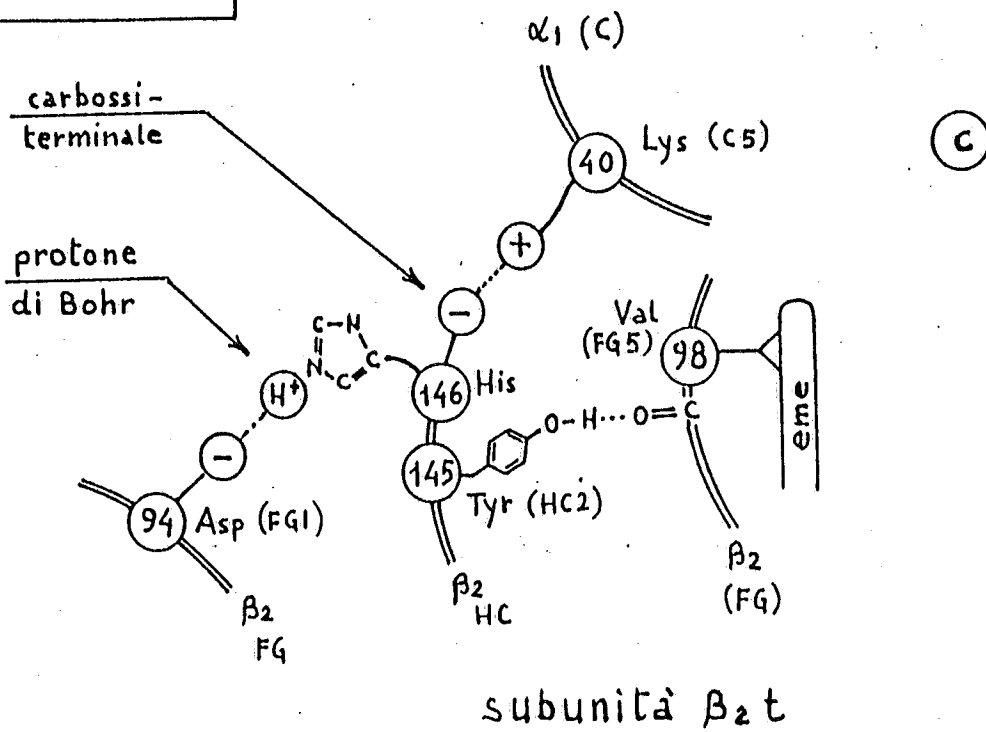
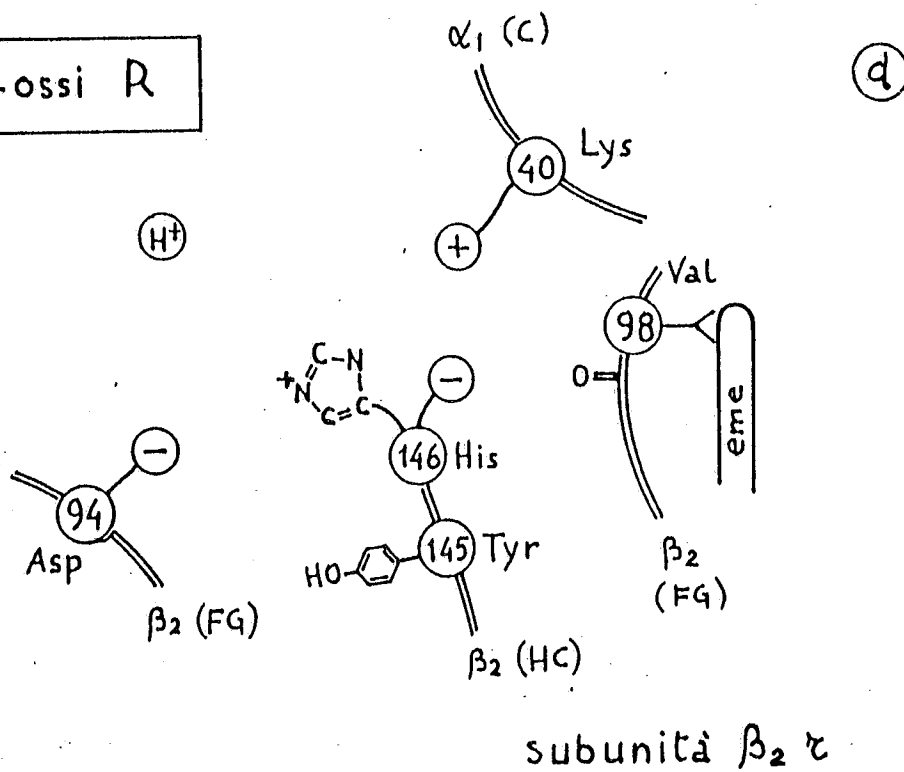


Fig. 6-13

Hb-ossi R



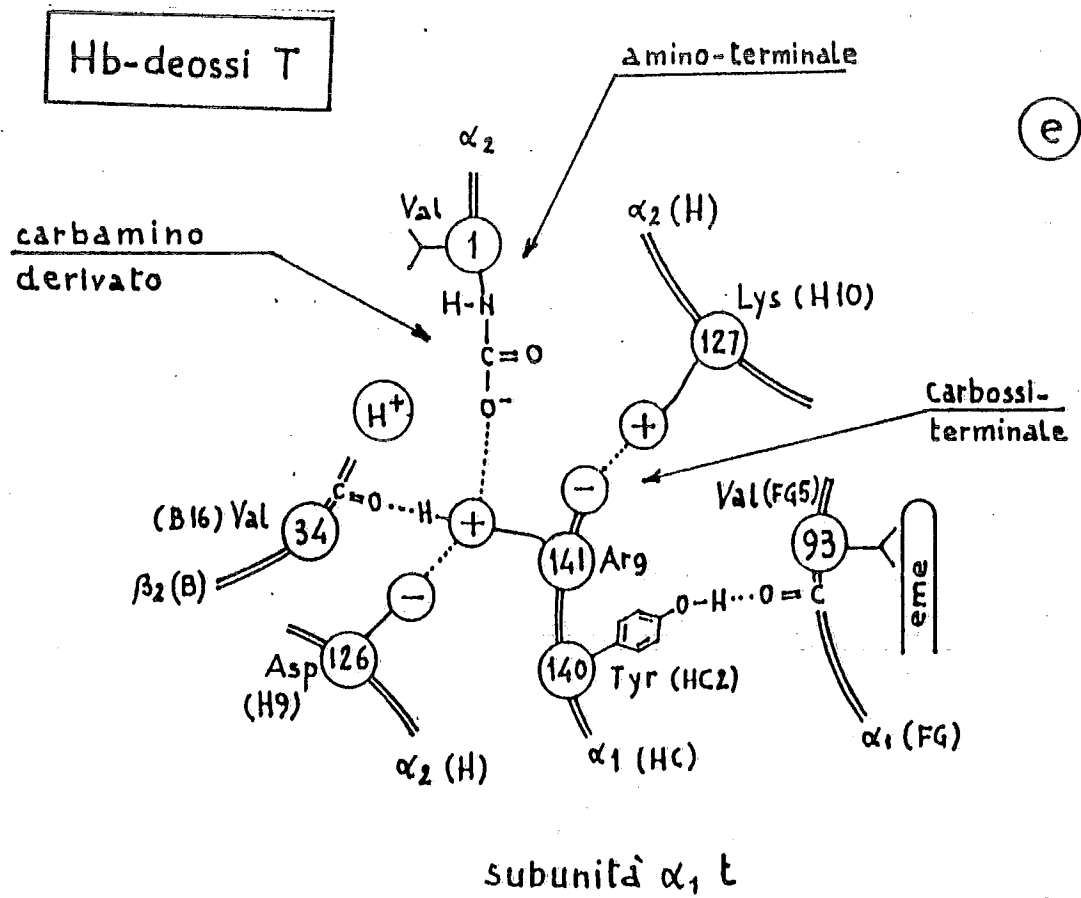


Fig. 6 - 13

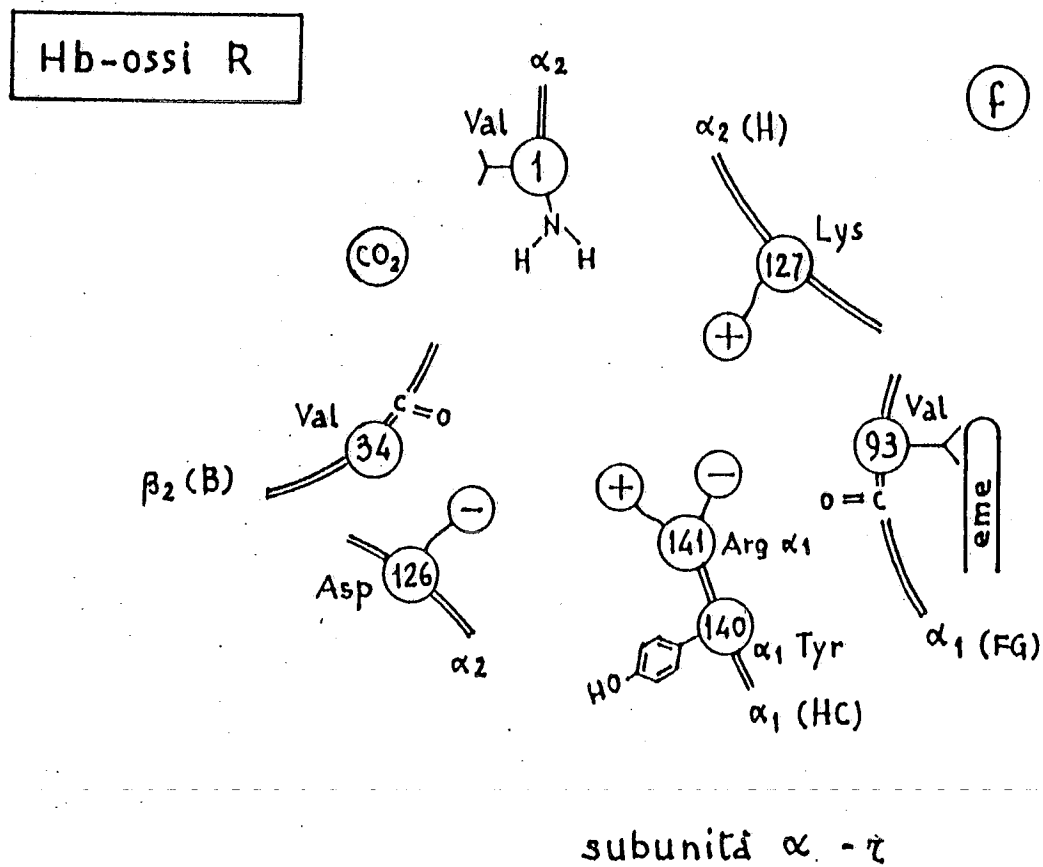


Fig. 6-14

Legami deboli intra ed intersubunità dell'Hb (da Biochemistry, 3rd Ed., L. Stryer, Freeman, USA, 1975. Ridisegnato e modificato).

Le doppie linee orizzontali indicano la struttura covalente della subunità α e β . Su esse sono indicati i residui aminoacidici che hanno un ruolo nel meccanismo di associazione cooperativa dell'O₂ e nei meccanismi allosterici operati da H⁺ e DPG. La quasi totalità di questi legami stabilizza la struttura terziaria delle subunità non ossigenate e/o la struttura quaternaria T. Due di questi legami stabilizzano la struttura quaternaria R. Il residuo di un aminoacido è indicato con un singolo tratto, il gruppo C=O con una doppia linea, vicino ad essi è posto il numero di sequenza ed il simbolo a tre lettere dell'aminoacido. Con tratteggio sono indicati i legami deboli che si spezzano con l'ossigenazione delle subunità: 1) con tratti rettilinei tratteggiati sono indicati i legami deboli intersubunità (quaternari, α - α , α - β); 2) con curve tratteggiate i legami intrasubunità (terziari) delle subunità β . Con linee tratto-punto sono indicati i legami intersubunità quaternari (α - β) che si formano e si spezzano con i cambiamenti di conformazione quaternaria (T---->R). Le frecce tratteggiate indicano i salini che ciascuna subunità β forma con il DPG. Si assume che la Lys 82 della subunità β_1 non interagisca con il DPG come in fig. 6-12. Il DPG non è indicato per semplificare il disegno.

a) L'Hb è nella conformazione T e non è ossigenata su nessuna subunità.

b) La subunità α_1 è ossigenata. Rispetto alla figura in a, sono spezzati i legami α_1 - α_2 ed α_1 - β_1 , è stato liberato il protone di Bohr e lo ione Cl⁻. Il gruppo -NH₂ terminale della subunità α_1 , non più impegnato nel legame salino, non è più carico.

c) Si è ossigenata la subunità α_2 con lo stesso meccanismo della subunità α_1 , con liberazione del secondo protone di Bohr, del secondo Cl⁻. La struttura quaternaria T dell'Hb è indebolita per la rottura dei legami quaternari α_1 - α_2 , α_1 - β_1 , α_2 - β_2 .

d) L'Hb ha cambiato la struttura quaternaria da T ad R, spezzando sei legami deboli (tre α_1 - β_1 e tre α_2 - β_2), liberando DPG (sette legami deboli spezzati) e formando quattro nuovi legami deboli (due α_1 - β_1 e due α_2 - β_2). Questi quattro nuovi legami deboli stabilizzano la struttura quaternaria R senza ostacolare i cambiamenti di struttura terziaria che le subunità β eseguono con l'ossigenazione (vedere fig. 6-11b). Nella conformazione Hb-R le subunità sono più libere di cambiare conformazione.

e) Si è ossigenata la subunità β_1 , si sono spezzati due legami intrasubunità, è stato liberato il protone di Bohr. Il gruppo NH₂-terminale non è più impegnato nel legame a H-salino) con il DPG.

f) Si è ossigenata la subunità β_2 con lo stesso meccanismo della β_1 e con la liberazione di un protone di Bohr. Per semplificare non si sono considerate nello schema le variazioni alla sequenza di ossigenazione. Ad esempio che la

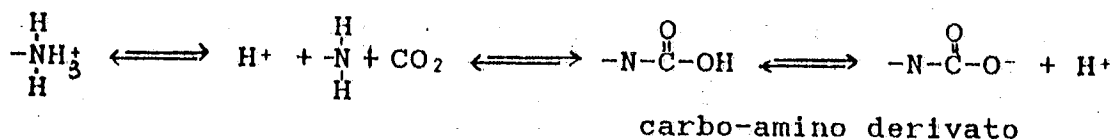
transizione T----> R avvenga dopo l'ossigenazione della β_1 . Non indicati in figura, sono presenti altri legami deboli che non interferiscono nei cambiamenti di struttura terziaria e quaternaria che avvengono con l'ossigenazione dell'Hb. Questi legami hanno la funzione di tenere sempre unite le subunità unite nei diversi stati conformazionali. g) E' schematizzata la struttura quaternaria T di Hb in cui sono presenti i carboamino derivati dei 4 gruppi amino-terminali. I carboamino derivati delle subunità α (Val 1) formano direttamente (senza H^+ e Cl^-) legami a H-salini con il residuo di Arg 141, stabilizzano la struttura deossi dell'Hb (come fanno i legami salini normali, vedere a), ed in questo modo riducono l'affinità dell'Hb per l' O_2 . I carboamino derivati dei gruppi aminici terminali delle subunità β interferiscono nella legatura del DPG e quindi "per se" fanno aumentare l'affinità dell'Hb per l' O_2 (vedere didascalia fig. 6-8c). Tuttavia la formazione dei carboamino derivati su una molecola di Hb, porta alla liberazione di protoni (da parte del carbossile che si è formato) e causa, per effetto Bohr, la riduzione di affinità di altre molecole di Hb.

Nelle subunità α si ha la riduzione di affinità per l' O_2 sulla stessa molecola di Hb per riformazione dei legami quaternari e, per mezzo degli H^+ liberati, anche su altre molecole di Hb. Mentre si ha un incremento di affinità sulle molecole di Hb che formano i carboamino derivati sulle subunità β e per mezzo degli H^+ liberati dagli stessi carboamino derivati, un decremento di affinità per l' O_2 di altre molecole di Hb.

Sulle subunità β , un effetto agisce in opposizione all'altro.

h) Con l'ossigenazione, il legame salino formato dai carboamino derivati delle subunità si spezza, con lo stesso meccanismo visto per i legami salini normali (vedere a). Viene assunto un protone per riprotonare il $-COO^-$ e riformare la CO_2 che viene liberata.

L'ossigenazione della subunità β porta alla liberazione di un protone di Bohr ed all'assunzione di un protone per permettere la rottura del legame carboamidico, e quindi la liberazione della CO_2 (vedere fig. 6-8c).



Ⓐ Hb-T ($\alpha_1 \alpha_2 \beta_1 \beta_2$)

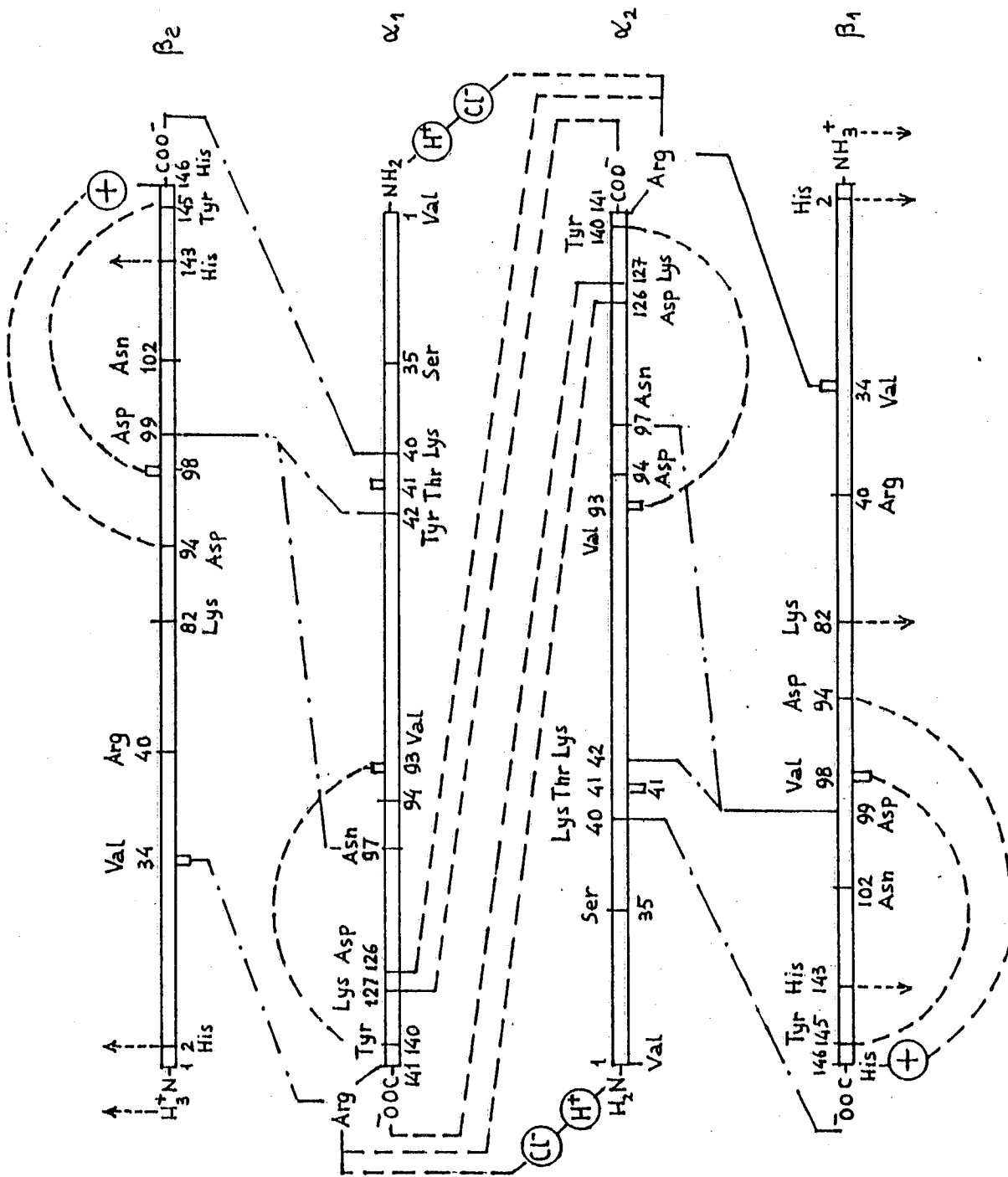
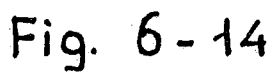


Fig. 6-14

⑥

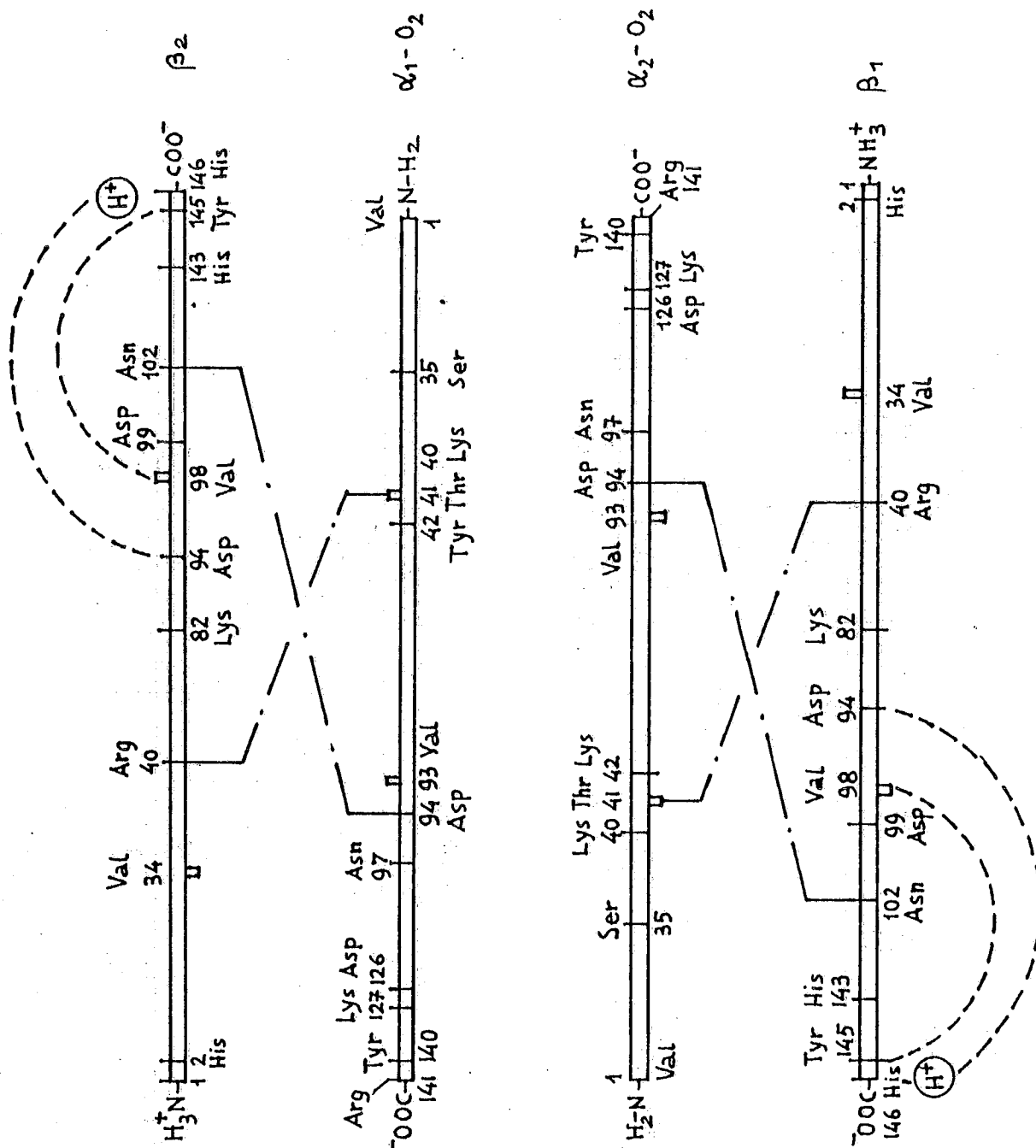


Fig. 6-14

$$Hb-T \quad (\alpha_1 O_2 \alpha_2 O_2 \beta_1 \beta_2)$$


(d)

Hb-R ($\alpha_1\text{O}_2\alpha_2\text{O}_2\beta_1\beta_2$)



DPG

Fig. 6-14

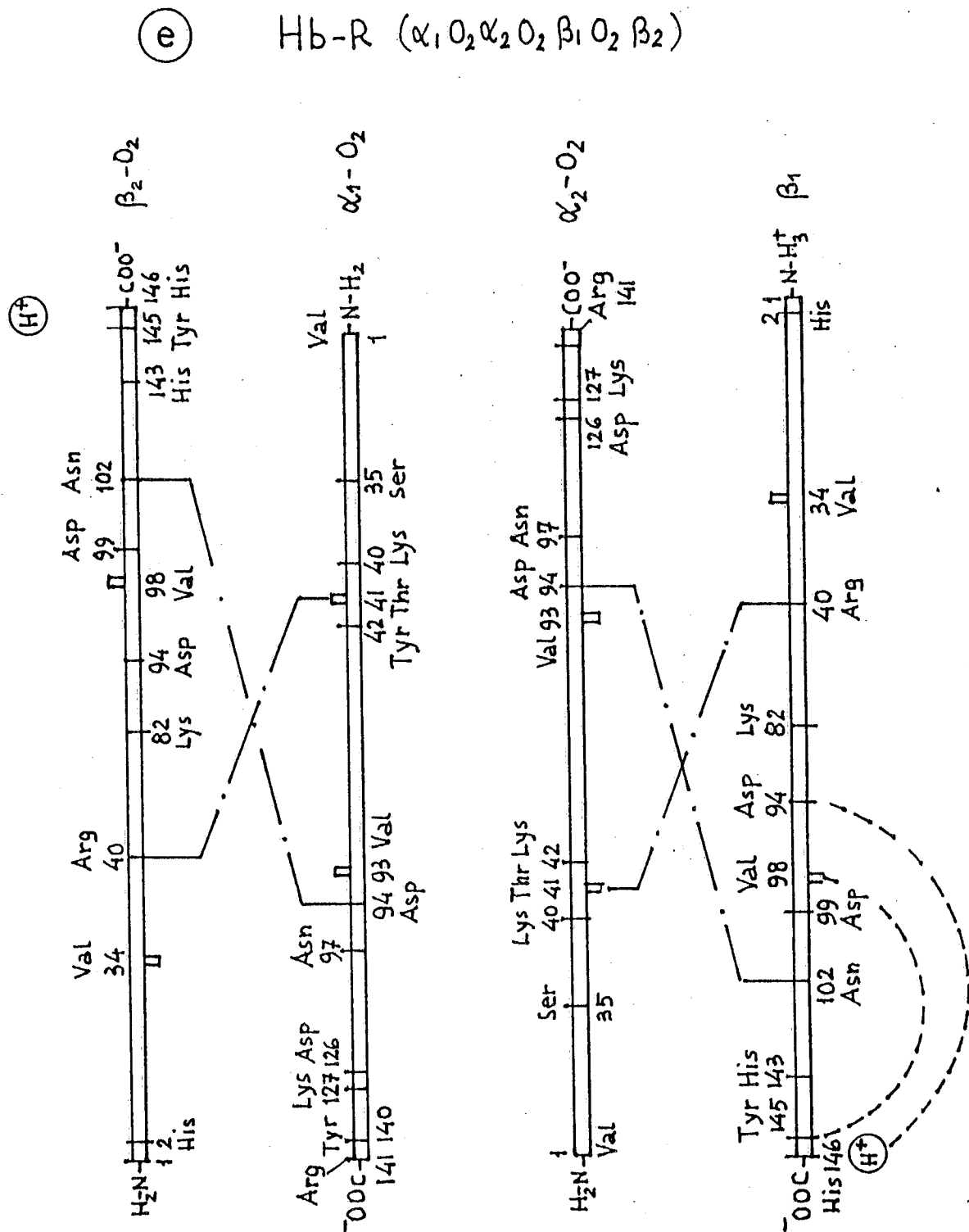


Fig. 6-14

(f)

Hb-R ($\alpha_1 O_2 \alpha_2 O_2 \beta_1 O_2 \beta_2 O_2$)

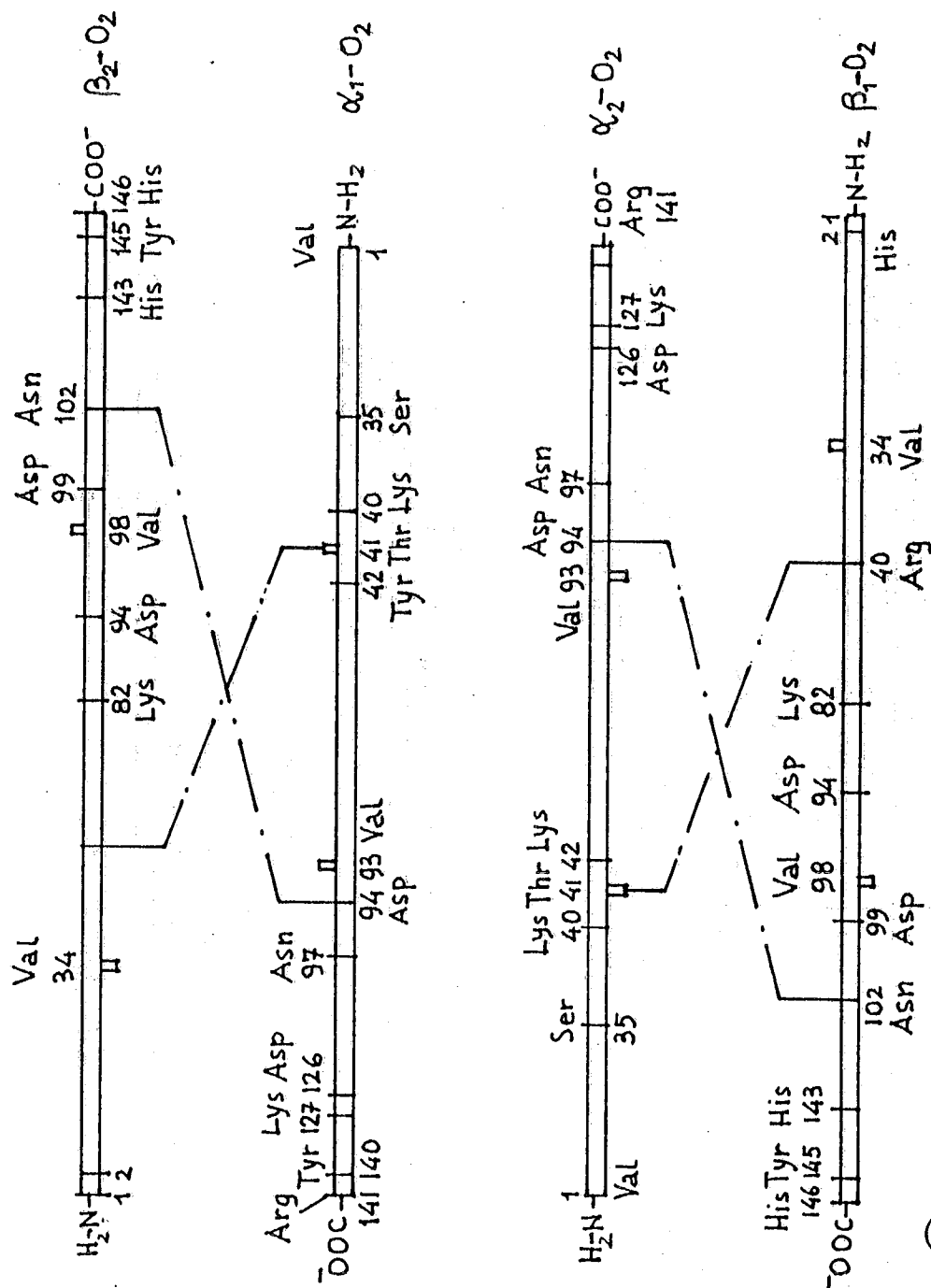


Fig. 6 - 14

20 HB-T ($\alpha_1 \alpha_2 \beta_1 \beta_2$)

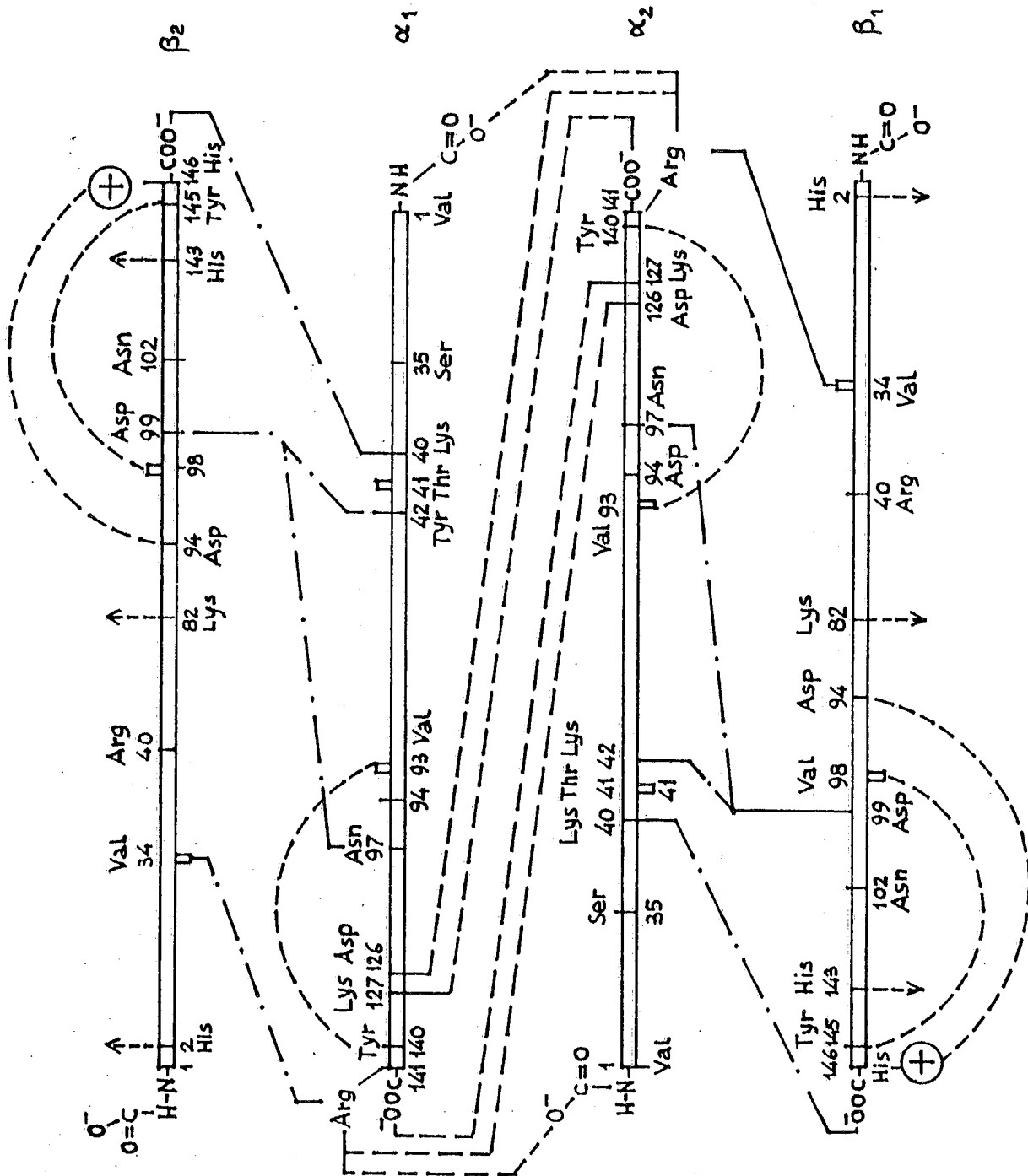


Fig. 6-14

(h)

Hb-R ($\alpha_1 O_2 \alpha_2 O_2 \beta_1 O_2 \beta_2 O_2$)

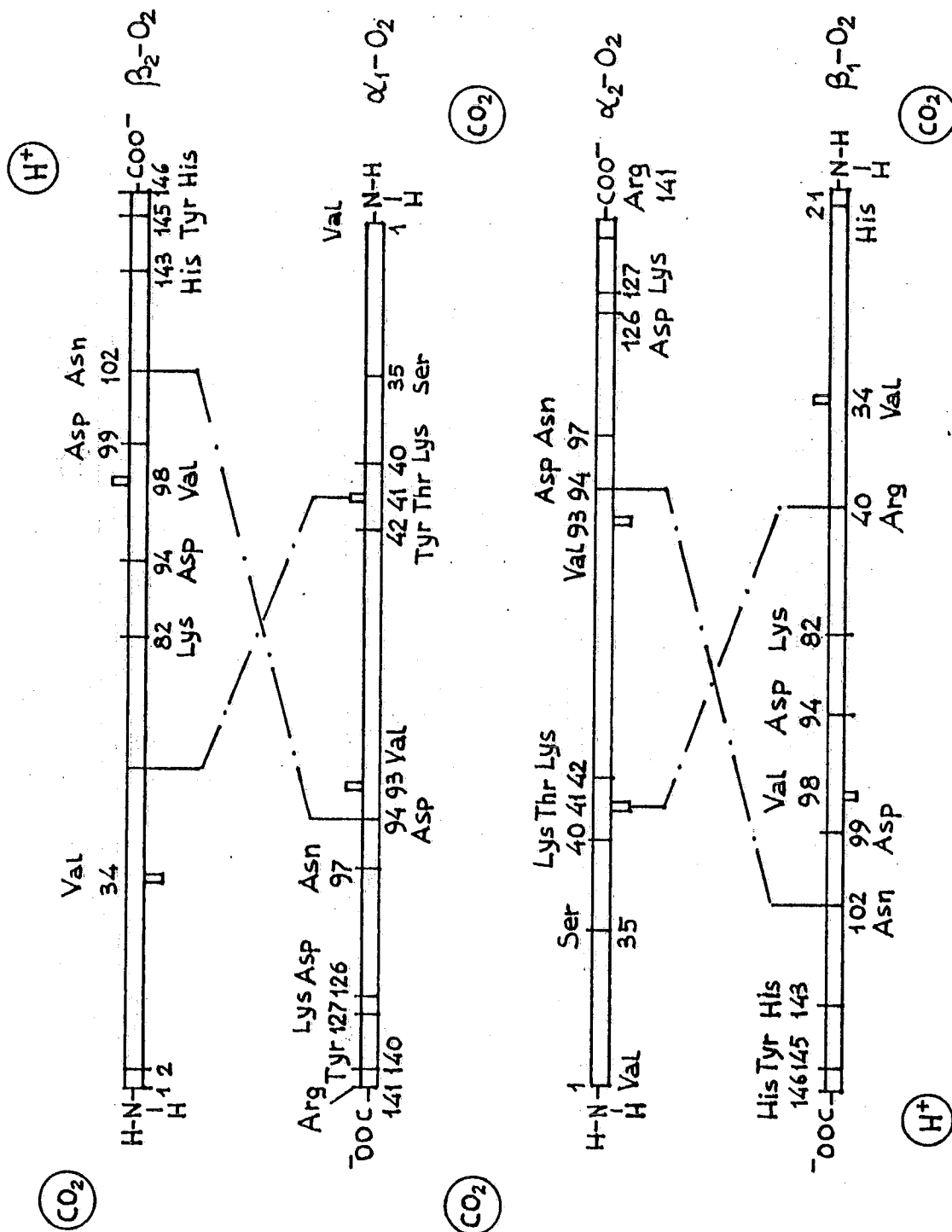


Fig. 6-14

Fig. 6-15

Disposizioni dell'istidina F8, della valina FG5 e dell'eme (da Hemoglobin, Dickerson R.E. e Geis I., Benjamin, USA, 1983. Ridisegnato e modificato).

- a) Disposizione dell'istidina F8 ($\alpha 87$, $\beta 92$) (prossimale), della valina FG5 ($\alpha 93$, $\beta 98$) e dell'eme in una subunità non ossigenata (conformazione t). L'eme può essere considerato come una piramide molto schiacciata, al cui vertice è posto l'atomo di ferro. Il ferro dista circa 6 Å dal piano che passa attraverso i 4 atomi di azoto dell'eme. L'istidina F8 forma un angolo di 8° con l'asse della piramide, la valina FG5 è in contatto con l'eme.
- b) Disposizione dell'His F8, della Val FG5 e dell'eme in una subunità (α o β) nella conformazione t^* , cioè di una subunità ossigenata in una molecola di Hb nella conformazione T. Con l'ossigenazione, la subunità ha subito un cambiamento di conformazione, che ha interessato principalmente l'elica F ed ha portato alla rottura dei legami salini al terminale carbossilico della stessa subunità (vedere figg. 6-13, 6-14, 6-17). L'ossigenazione ha ridotto il diametro dell'atomo di Fe, ed a causa di questa riduzione His F8 e Val FG5 si avvicinano all'eme entrando in contatto con esso (cioè gli atomi sono più vicini dei rispettivi raggi di van der Waals). Contatti esistono anche tra ossigeno e atomi di azoto (le zone di contatto sono tratteggiate). Il contatto crea tensione nella subunità perchè si oppone all'avvicinamento dell'istidina e valina all'eme, che invece tendono ad avvicinarsi all'eme perchè il Fe tende a seguire l'appiattimento dell'eme.
- c) E' mostrata la situazione dell'eme di una subunità ossigenata nella conformazione r, cioè quando la Hb è nella conformazione R. La conformazione R dell'Hb permette alle subunità che sono già ossigenate o che si ossigenano, di inclinare verso destra l'His F8 e la Val FG5, ed evitare così i loro contatti con l'eme. L'istidina è ora disposta perpendicolarmente al piano dell'eme. L'eme si è schiacciato e non ha più contatti con l'O₂. Ora il ferro dista circa 0,2 Å dal piano che passa per gli atomi di N dell'eme.

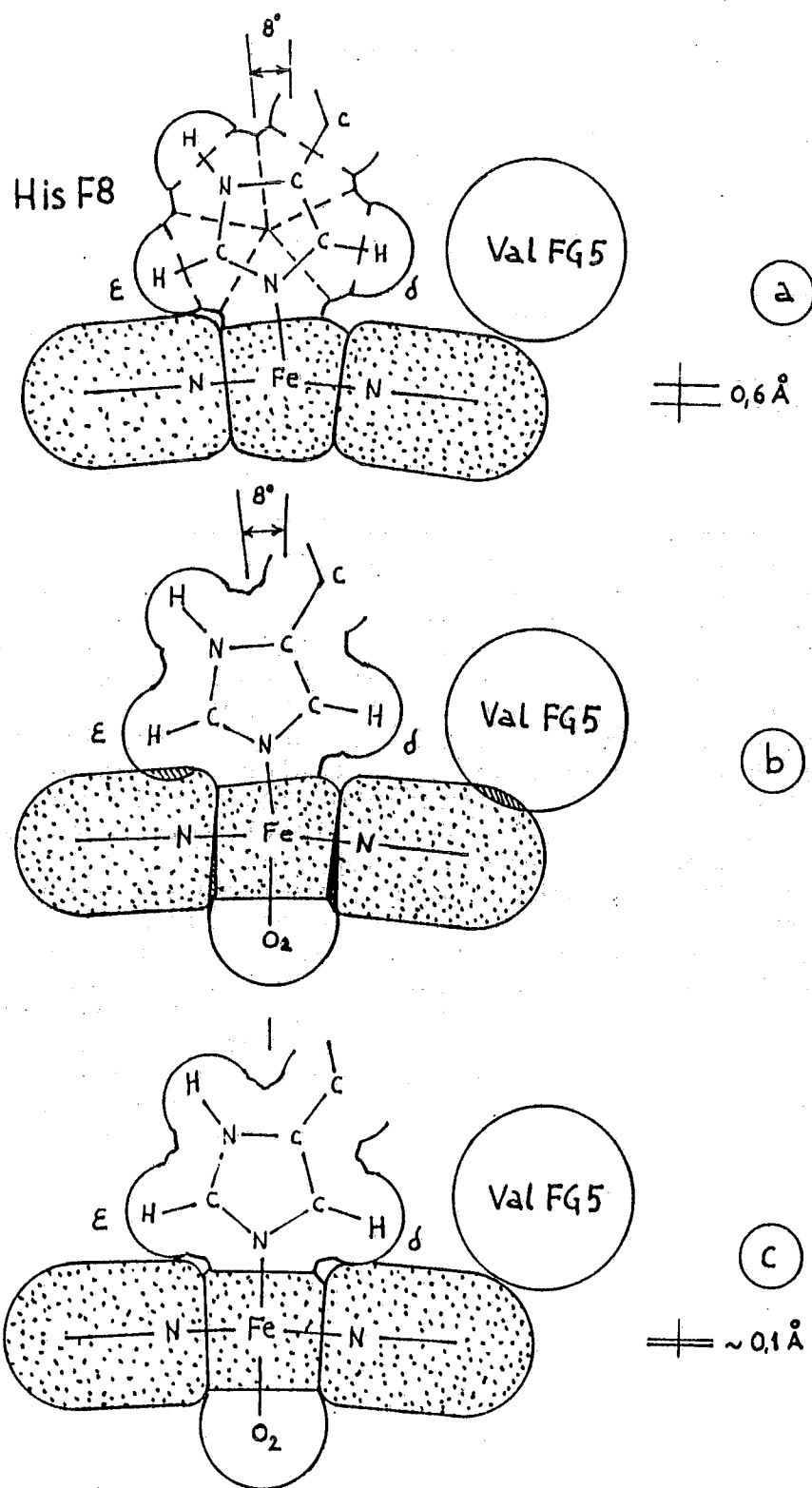


Fig. 6-15

Fig. 6-16

Impacchettamento del residuo di istidina F8 nella subunità β .

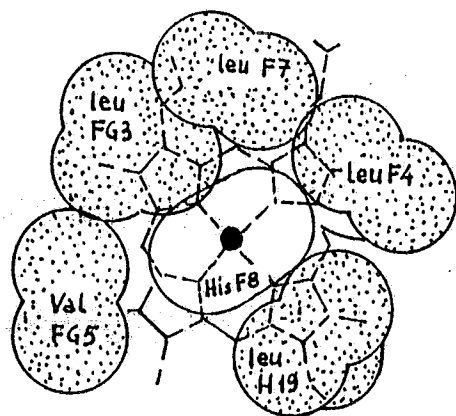
Analoga situazione si ha nelle subunità α e nella Mb.

a) L'istidina F8, vista da un punto perpendicolare all'eme, è circondata da residui idrofobici che ne impediscono i movimenti in senso laterale nell'Hb-T (vedere anche fig. 6-17).

L'eme con al centro il Fe (cerchio nero) è disegnato con linee tratteggiate.

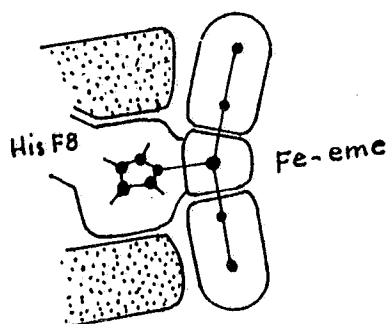
b) L'istidina F8 vista di lato.

(Fig. a da Hemoglobin, Dickerson R.E. e Geis I., Benjamin, 1983. Ridisegnato e parzialmente modificato).



a

Fig. 6-16



b

Fig. 6-17

Cambiamenti di conformazione dell'elica F in conseguenza dell'associazione dell'ossigeno al Fe-eme.

Con linea unita, la struttura nella condizione in cui il Fe-eme non ha associato l'O₂; con linea tratteggiata, la stessa struttura nelle condizioni in cui il Fe-eme ha associato l'O₂. Linea punteggiata, legame a H tra Tyr 145 ed il CO di Val 98. Al fine di rendere più evidente lo spostamento, il diametro del ferro, lo spostamento dell'eme e dell'elica F sono stati aumentati.

a) La figura mette in evidenza che con l'ossigenazione si ha una riduzione dell'atomo del Fe ed uno schiacciamento dell'eme. Ciò fa avvicinare e verticalizzare, rispetto al piano dell'eme, l'istidina F8 e spostare verso il bordo dell'eme la Val FG5. Questi spostamenti sono accompagnati da uno spostamento di tutta l'elica F e quindi anche dei residui dell'elica F che circondano l'istidina F8 (vedere fig. 6-16). Lo spostamento dell'elica F è necessario perché con essa vengono spostati residui che ingabbiano l'istidina F8, che ne impediscono soprattutto il cambiamento di inclinazione (vedere figg. 6-15, 6-16).

b) La figura mette in evidenza il meccanismo che associa l'ossigenazione della subunità β (nelle subunità α il meccanismo è identico) con la rottura del legame a H della Tyr 145 (penultimo aminoacido) con il CO della Val 98 della stessa subunità. L'ossigenazione del ferro causa lo spostamento dell'elica F e quindi anche del residuo di Val 98. Poiché il CO della Val 98 forma il legame a H con la Tyr 145, il legame viene indebolito per stiramento. Inoltre la parte carbossi-terminale della stessa subunità si sposta in direzione opposta all'elica F, per cui il legame a H Tyr 145-Val 98 viene ulteriormente indebolito e poi spezzato. La rottura di questo legame favorisce la rottura di altri legami a idrogeno esistenti tra l'ultimo aminoacido (β 146 e α 141) e quindi si ha liberazione del protone di Bohr (vedere figg. 6-13, 6-14).

In questo modo sono collegati gli eventi dell'associazione dell'O₂ al Fe-eme, i cambiamenti di struttura terziaria, la rottura dei legami deboli ai terminali carbossilici delle subunità e la liberazione del protone di Bohr.

Nelle figure a e b sono indicati i cambiamenti di struttura che si hanno con l'ossigenazione di una subunità che passa dalla conformazione t ad r. Si assume che la subunità che ossigenandosi passa da t a t*, compia dei cambiamenti strutturali nella zona dell'eme, minori, ma che portano egualmente alla rottura del legame Tyr 145-CO Val 98 e dei legami salini al carbossi-terminale con liberazione del protone di Bohr.

(Fig. 50a, da Biochemistry, 2nd Ed., L. Stryer, 1975 e Fig. 50b, da Hemoglobin, R.E. Dickerson e I. Geis, ambedue ridisegnati e modificati).

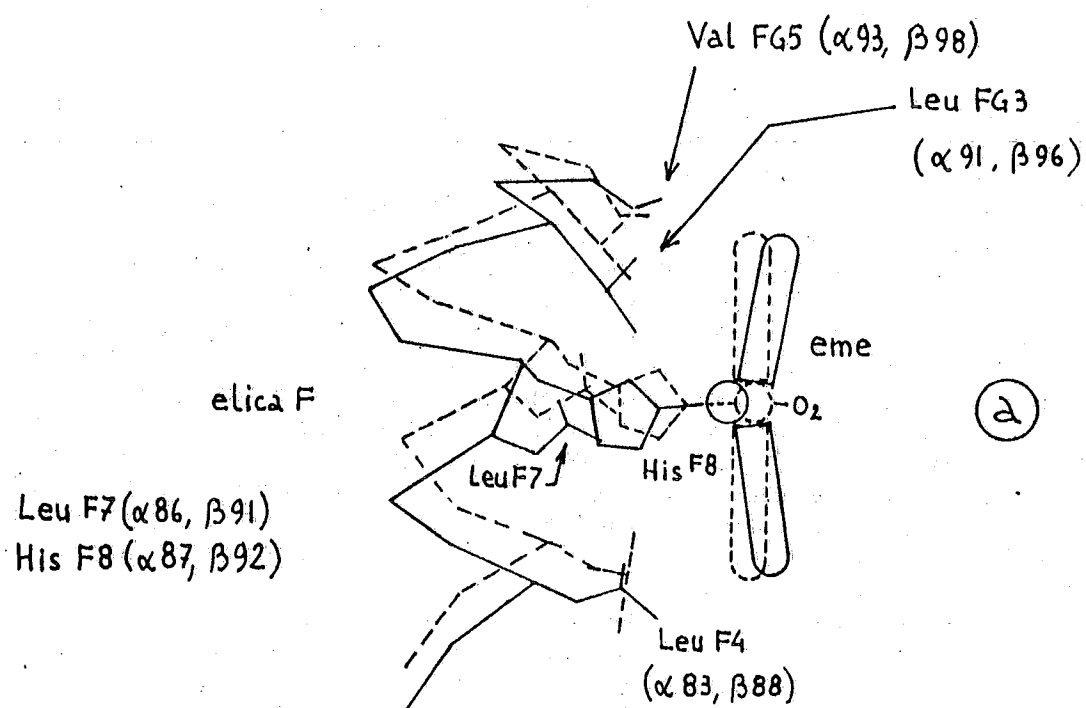
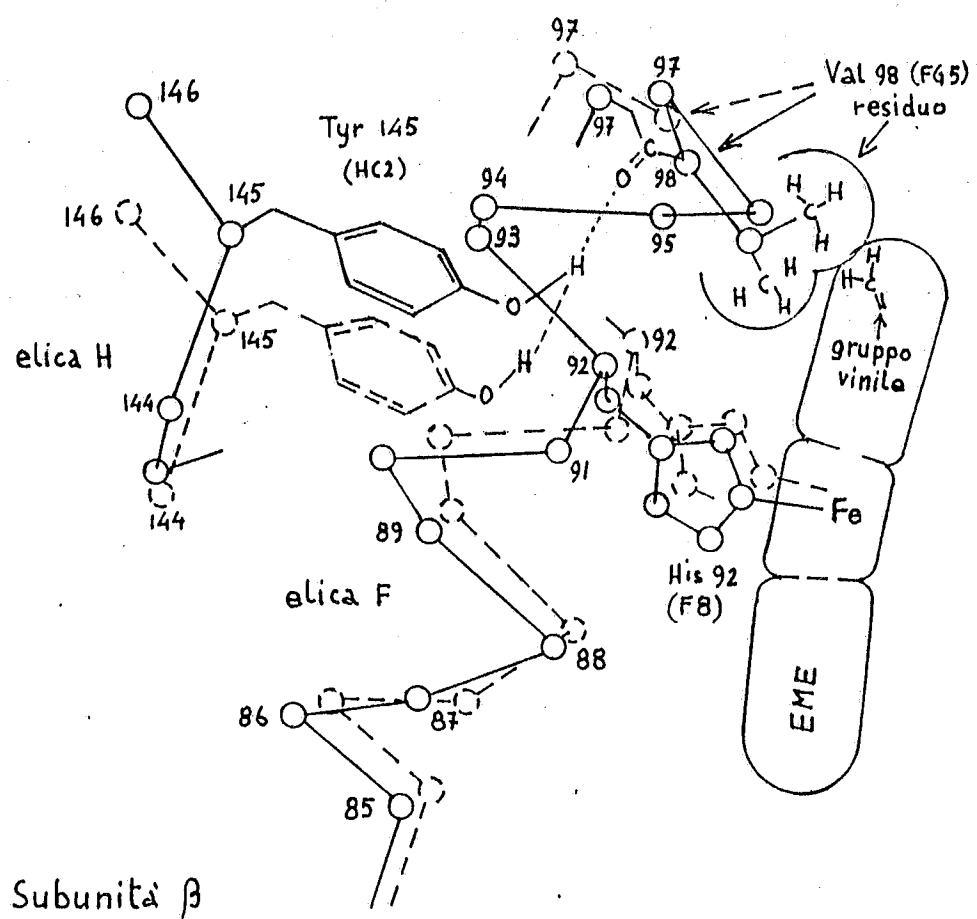


Fig. 6 - 17



(b)

Fig. 6 - 17

Fig. 6-18

Regione dell'eme di una subunità β (da Hemoglobin, R.E. Dickerson e I. Geis, 1983, Benjamin, USA. Ridisegnato e parzialmente modificato).

La figura mostra la disposizione della istidina prossimale F8 che forma il 5° legame di coordinazione con il Fe, e dell'istidina distale E7, che è spostata a più distanza dal ferro. Questa maggiore distanza permette l'accesso dell' O_2 ed anche una debole interazione tra His E7 e l' O_2 associato al ferro. L'eme si trova inserito in una tasca all'interno delle subunità α e β (fig. 6-3) ed ha i suoi residui di acido propionico disposti verso l'esterno (superficie del foglio).

L'accesso dell' O_2 è limitato ad una apertura posta dalla parte dell'istidina E7. Il residuo della Val β 67 (E11) è posto in questa apertura ed ostacola così l'accesso dell' O_2 verso il Fe. Ciò rende l'ossigenazione delle subunità β meno probabile di quella delle subunità α . Nelle subunità α la Val E11 è disposta in maniera leggermente diversa e non ostacola l'accesso dell' O_2 .

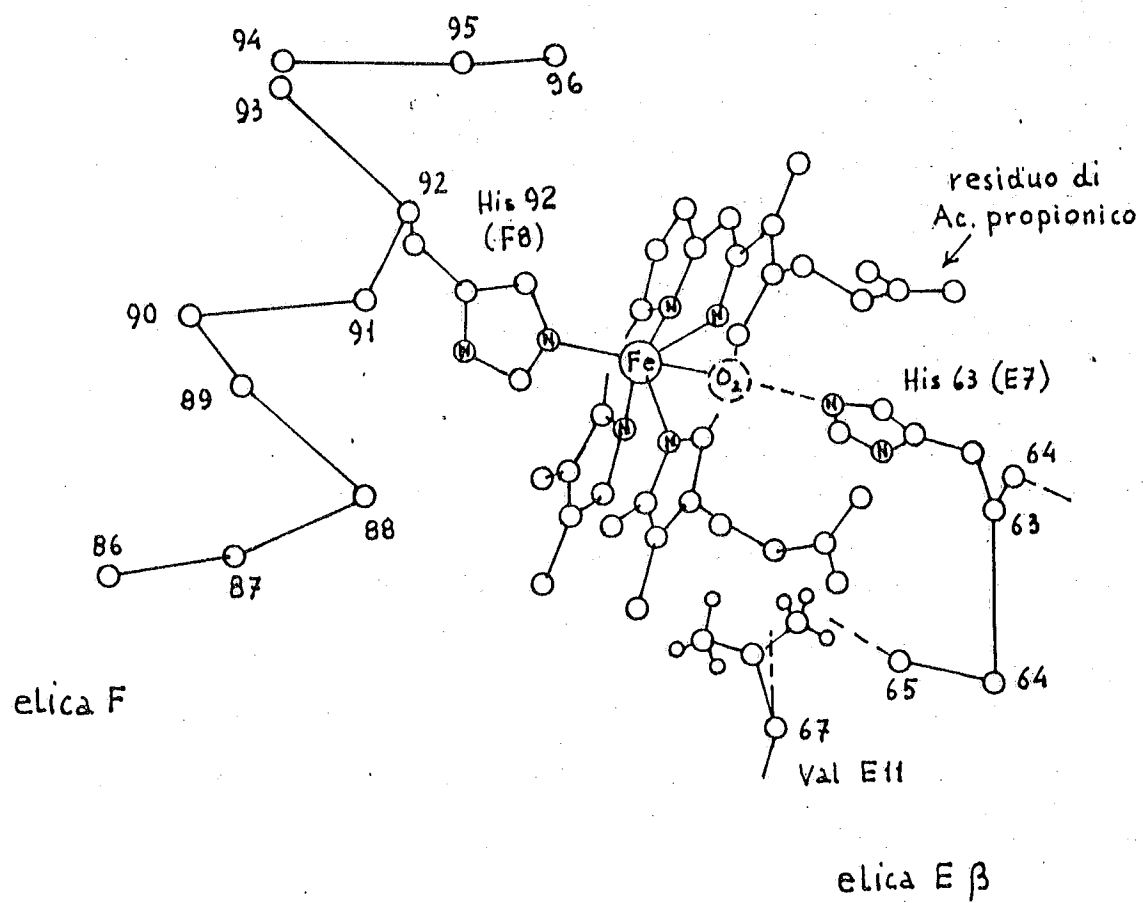


Fig. 6-18

Fig. 6-19

Curve di saturazione dell'Hb.

Si assume che:

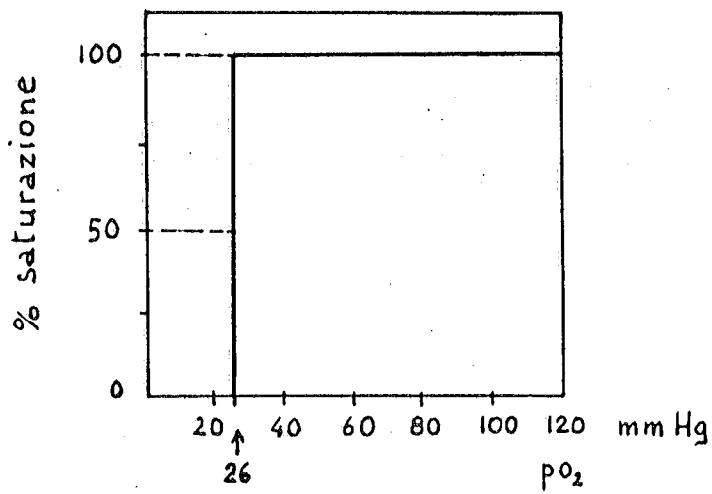
- a) tutte le molecole di Hb siano allo stesso livello energetico, con identiche conformazioni terziarie e quaternarie, con identico numero e tipo di legami deboli e che una volta ossigenate non dissocino più l'O₂
- b) tutte le molecole di Hb siano identiche come stato energetico e strutturale (come in a) ma una volta ossigenate possano dissociare l'O₂ (spezzata tratteggiata), o dopo l'ossigenazione della prima subunità α , le molecole di Hb possano assumere stati energetici e conformazionali diversi (curva iperbolica)
- c) in ogni momento le molecole di Hb possano esistere in stati energetici diversi. La differenza energetica è relativamente piccola, ma sufficiente a determinare stati conformazionali diversi, più o meno stabili. Si assume che questa condizione sia la più vicina alla realtà (curva sigmoide).

Sopra il grafico sono indicati i modelli degli stati conformazionali dell'Hb. Quadrati Hb-T e cerchi Hb-R. Senza ossigeno si assume che l'Hb sia tutta nella conformazione T, e in concentrazioni di O₂ saturanti, che tutta l'Hb sia nella conformazione R. Alla pO₂ di 26 mm di Hg, il 50% dell'Hb è ossigenato e nella forma R, ed il rimanente 50% dell'Hb è completamente deossigenato e nella forma T.

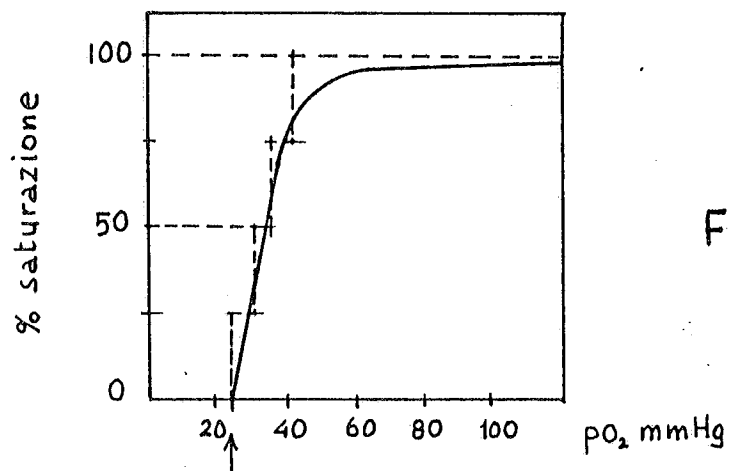
A pO₂ più basse le quantità relative di Hb-T aumentano e a pO₂ più alte aumentano le quantità relative di Hb-R.

A causa del calore, alcune molecole di Hb possono assumere per breve tempo la conformazione R anche senza essere ossigenate, che in presenza di O₂ esistono piccole quantità di Hb parzialmente ossigenate, e che anche in condizioni saturanti di O₂, a causa delle reversibilità della reazione di ossigenazione, esistono, anche se pochissime, molecole di Hb non ossigenate e nella conformazione T.

Per ulteriori dettagli vedere il testo.

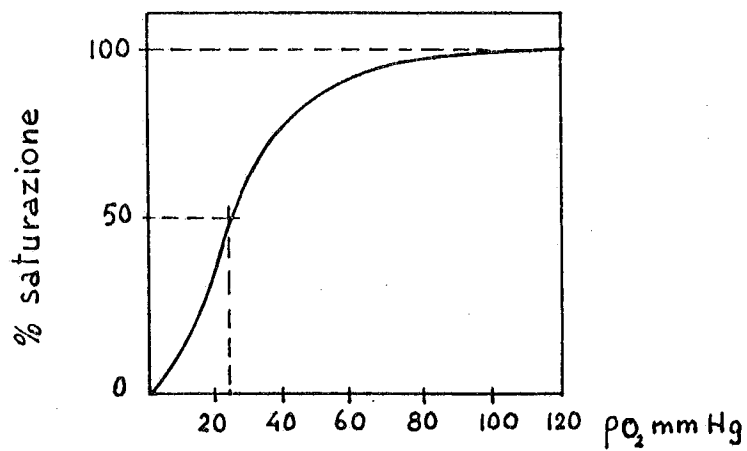
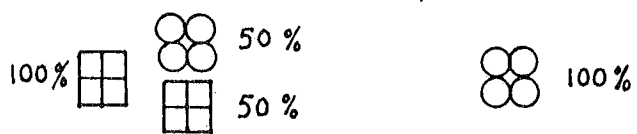


(a)



(b)

Fig. 6-19



(c)

Fig. 6-20

Curva di saturazione dell'emoglobina fetale (HbF) e dell'emoglobina adulta (HbA) in presenza di DPG. Le curve di ossigenazione indicano che l'HbF ha maggiore affinità per l'O₂ dell'HbA. Quindi, a parità di pO₂ l'ossigeno si associa preferenzialmente all'HbF (vedere anche fig. 2-6).

(Da Biochemistry, 2nd Ed., L. Stryer, Freeman 1975. Ridisegnato e modificato).

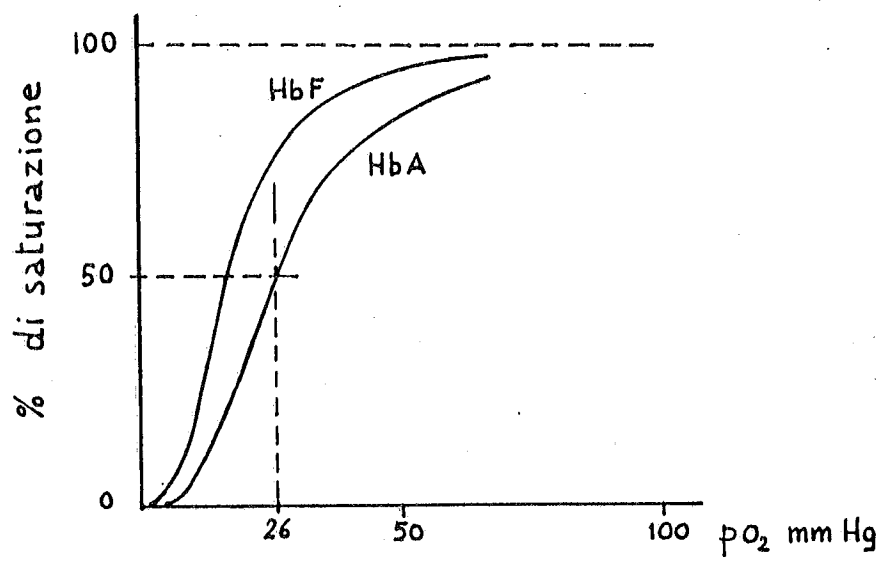


Fig. 6-20

Regolazione del metabolismo nei tessuti umani.**Fegato.**

Il fegato è una centrale metabolica per tutto l'organismo: per l'organismo regola la glicemia, assumendo glucosio dal sangue quando è in eccesso (trasformandolo in glicogeno e acidi grassi), liberando glucosio nel sangue quando è scarso. Il glucosio liberato proviene dal glicogeno epatico o è neosintetizzato nel fegato da aminoacidi epatici e da aminoacidi provenienti dal tessuto muscolare scheletrico. Il fegato ha il patrimonio enzimatico per catabolizzare tutti gli aminoacidi e per sintetizzare i non-essenziali, sintetizza l'urea, il colesterolo, purine, pirimidine, eme e proteine di trasporto del plasma. Generalizzando si può dire che il fegato, rispetto agli altri organi, ha il patrimonio enzimatico più vasto, che risulta nella capacità di utilizzare a fini catabolici tutti i metaboliti cellulari, ha una vasta gamma di vie sintetiche ed alcune di queste con capacità di sintesi maggiori rispetto alle stesse vie presenti in altri tessuti.

La carta delle vie metaboliche sintetiche e degradative del fegato è un intreccio di reazioni la cui comprensione immediata è a prima vista difficile. Se alle vie metaboliche si vuol aggiungere la regolazione da effettore, cioè le reazioni di associazione tra metaboliti effettori ed enzimi regolati, l'intreccio diviene ancora più complicato.

Al fine di spiegare nel dettaglio la regolazione e renderne più semplice la comprensione, sono stati rappresentati in figure distinte: a) gli effetti dei principali inibitori del metabolismo ossidativo (ATP fig. 7-1 e NADH fig. 7-2), b) la regolazione da substrato e da effettore del fegato alimentato con un solo tipo di alimento (carboidrati fig. 7-3, lipidi fig. 7-5, proteine fig. 7-6), nel fegato alimentato con i tre tipi di alimenti (fig. 7-7), del fegato digiuno (fig. 7-8), c) la regolazione ormonale del fegato alimentato (fig. 7-12) e del fegato digiuno (fig. 7-13). E' stata anche considerata la regolazione delle sintesi di alcuni composti speciali nel fegato: colesterolo (fig. 7-14), eme (fig. 7-15), purine e pirimidine (fig. 7-16) e desossi ribonucleotidi (fig. 7-17).

L'analisi comparativa delle varie figure mostra che 1) lo stesso metabolita può svolgere più funzioni: funzioni metaboliche (substrato in più reazioni), di regolazione (effettore di più enzimi), con più tipi e livelli di responsabilità (inibisce o attiva, agisce su uno o su più di un enzima, e l'azione è maggiore su un enzima rispetto agli altri). 2) un enzima può essere sensibile a metaboliti prodotti finali di più vie metaboliche, cioè da effettori dello stesso segno o di segno opposto (attivatori ed inibitori), ed in questo modo è regolato in relazione a condizioni metaboliche diverse che causano variazioni della C_{ss} di un effettore ma non degli altri.

Gli schemi proposti hanno lo scopo di introdurre allo studio della regolazione del metabolismo. Essi includono tutte le

ipotesi sulla regolazione delle vie metaboliche di quella particolare cellula, in quella particolare condizione metabolica dell'uomo. Le ipotesi sono basate sui dati sperimentali che mostrano l'azione di effettori ed ormoni su enzimi, la proprietà di regolazione degli enzimi, la permeabilità dei metaboliti alla membrana cellulare, le concentrazioni allo stato stazionario dei metaboliti e dei metaboliti effettori.

La regolazione è riferita all'uomo anche se parte dei dati sono stati ottenuti in tessuti di mammifero (ratto, topolino, cavia).

Tessuto muscolare scheletrico

La principale funzione delle fibre muscolari è la contrazione. La contrazione chiede molta energia in tempi brevi ed il metabolismo delle fibre muscolari è costruito per fornire grosse quantità di ATP. La fibra muscolare è capace di produrre ATP aerobicamente ed anaerobicamente. La sintesi aerobica di ATP avviene per le fibre in riposo od in contrazione lenta, mentre la sintesi anaerobica di ATP avviene in fibre in contrazione veloce, all'inizio delle contrazioni lente e veloci, nelle contrazioni isometriche, perchè, in tutti questi tipi di contrazione, l'apporto di O_2 è insufficiente in relazione alla grande richiesta di ATP. La glicolisi anaerobica utilizza obbligatoriamente il glicogeno contenuto nella fibra stessa, perchè come accade per l' O_2 , l'apporto di glucosio ematico alle fibre muscolari è insufficiente ad alimentare la glicolisi anaerobia. La regolazione da substrato e da effettori del metabolismo energetico (sintesi e degradazione del glicogeno, glicolisi, ciclo di Krebs, sintesi e degradazione degli acidi grassi e dei trigliceridi, P-ossidativa) della fibra avviene con gli stessi meccanismi molecolari (stessi substrati, stessi effettori, stessi enzimi regolati) che sono stati descritti nel fegato. Tuttavia, esistono alcune differenze nella regolazione e nel patrimonio degli enzimi che determinano un metabolismo molto diverso nei due tessuti, per la qualità e quantità dei prodotti finali sintetizzati. Nel muscolo l'enzima piruvato cinasi (PC) non è inibito da alanina (come è l'enzima del fegato), mentre è inibito da P-creatina (a cui non è sensibile l'enzima degli epatociti, cellule sprovviste di P-creatina). Nel muscolo, sono assenti la G6P-fosfatasi, la glucocinasi e gli enzimi per la neosintesi di acidi grassi; piruvato carbossilasi e $PEP\text{CO}_2$ cinasi sono presenti in concentrazioni molto basse rispetto al fegato. Queste differenze rendono la fibra muscolare capace di utilizzare la propria riserva di glicogeno per alimentare la glicolisi e quindi le contrazioni della fibra stessa. L'assenza di G6P-fosfatasi nel muscolo evita che le riserve muscolari di glicogeno siano convertite in glucosio e per via ematica siano utilizzate da altri tessuti. L'assenza o la bassa concentrazione degli enzimi (piruvato cinasi, $PEP\text{CO}_2$ cinasi e della neolipogenesi), l'insensibilità della piruvato cinasi M (muscolare) all'alanina ed agli ormoni, rendono il muscolo incapace di gluconeogenesi e di neolipogenesi. L'analisi comparativa delle vie metaboliche e dei meccanismi molecolari di regolazione del fegato e del tessuto

muscolare, mostra che le grandi differenze nelle capacità metaboliche dei due tessuti risultano dalla differente regolazione di un numero relativamente piccolo di geni. Anche questa analisi mostra come la natura riesca a determinare grossi cambiamenti di funzione con relativamente poche sostituzioni di molecole. Queste differenze sono le tracce del processo di evoluzione molecolare e caratterizzano il differenziamento molecolare dei tessuti. La regolazione da substrato, da effettori ed ormonale delle vie metaboliche del metabolismo energetico delle fibre muscolari in condizioni di riposo e contrazione veloce e lenta, sono descritte nelle figure 7-19+7-21. Nella figura 7-24 è descritto il meccanismo di potenziamento della regolazione da effettore e da ormone dei due enzimi che catalizzano le reazioni dei cicli di substrati, e l'implicazione dei cicli dei substrati nel mantenimento del peso corporeo. In figura 7-18 è descritta la regolazione della sintesi dell'eme nei reticolociti.

Alcune considerazioni sulla regolazione ormonale.

L'analisi comparativa delle figure 7-9, 7-12, 7-13, 7-22, mostra che la regolazione delle vie metaboliche operata da effettori e quella operata da ormoni sono integrate fra loro.

La regolazione ormonale è gerarchicamente più importante in relazione alla sua funzione coordinatrice delle attività metaboliche dei vari tessuti per ottenere il miglior funzionamento dell'organismo. Essa influenza la maggior parte degli enzimi regolati da effettori, rendendone alcuni insensibili agli effettori quando le due regolazioni (ormonale e da effettori) sarebbero in contrasto. Alcuni enzimi regolati da effettori sono insensibili all'azione diretta degli ormoni, tuttavia l'azione ormonale controlla anche questi enzimi, regolando la C_{ss} dei loro substrati e dei loro effettori.

La secrezione degli ormoni può avvenire automaticamente in risposta a segnali chimici presenti nel sangue. La secrezione di insulina e del glucagone è stimolata automaticamente e rispettivamente da un incremento e da un decremento della C_{ss}-glucosio nel sangue (figg. 7-9+7-11). La secrezione di ormoni può essere stimolata direttamente dal sistema nervoso. Il sistema nervoso media ed integra stimoli provenienti dall'ambiente, e gli ormoni secreti per azione del sistema nervoso, in risposta a stimoli ambientali, appaiono gerarchicamente più importanti di quelli secreti automaticamente per azione di stimoli endogeni. Le catecolamine sono secrete per azione diretta del sistema nervoso sulla midollare del surrene di un individuo che percepito con gli organi di senso qualcosa: piacevole o spiacevole) (figg. 7-9+7-11, 7-13, 7-22). Le catecolamine causano iperglicemia ed inibiscono anche la secrezione di insulina, la cui azione si opporrebbe all'effetto iperglicemizzante delle catecolamine, mentre non inibiscono l'azione del glucagone che è iperglicemizzante. Il glucagone che antagonizza l'azione dell'insulina, non ha effetti sulla secrezione dell'insulina essendo secreto in

condizioni metaboliche in cui non è secreta l'insulina. La secrezione di ormoni per azione di stimoli endogeni è regolata in modo che gli ormoni antagonisti siano opportunamente secreti in stati metabolici diversi, al fine di non interferire tra loro (ad esempio: insulina e glucagone). L'azione degli ormoni secreti in risposta a stimoli esterni (via il sistema nervoso) a causa dell'imprevedibilità, rapidità ed importanza di molti di questi stimoli, è costruita in modo da imporsi sulla condizione metabolica presente al momento dell'insorgenza dello stimolo esterno, inibendo la secrezione degli ormoni che la antagonizzano (esempio: catecolamine ed insulina), mentre non interferisce sulla secrezione degli ormoni che collaborano con essa (esempio: catecolamine e glucagone). La cellula, tutto ciò che è contenuto in essa, gli organi subcellulari, le macromolecole, le vie metaboliche, la loro regolazione da effettori ed ormonale, risultano da una continua regolazione della espressione genica, cioè dall'attuazione del programma scritto nel DNA contenuto nella cellula stessa. Tutte le cellule somatiche di uno stesso organismo hanno lo stesso patrimonio genetico. Una diversa regolazione dell'espressione qualitativa e quantitativa dei geni di uno stesso patrimonio, conferisce alla cellula una composizione di macromolecole diverse, e/o presenti in quantità diverse, che a loro volta formano strutture sopramolecolari diverse, conferendo alla cellula caratteristiche morfologiche, funzionali, metaboliche e di regolazione diverse. Diversità morfologiche e diversità funzionali-metaboliche sono inseparabili perchè ambedue dipendenti dalla stessa composizione qualitativa e quantitativa di macromolecole. In uno stesso organismo, cellule di tipo diverso sono il risultato di una diversa regolazione dell'espressione genica. La regolazione dell'espressione genica può, entro certi limiti, essere variata dal tipo di alimentazione che agisce attraverso l'azione degli ormoni, l'esercizio fisico che promuove l'incremento delle proteine contrattili, della vascolarizzazione attraverso l'azione degli ormoni e del sistema nervoso, cioè dal "tipo di vita" che l'individuo vuole e può condurre.

Appendice 1. Concentrazione di metaboliti nelle cellule e nei fluidi biologici in individui diversi

I valori delle concentrazioni dei metaboliti cellulari e dei fluidi biologici, possono variare molto da individuo ad individuo. E' accertato che esiste una variabilità della C_{ss} dei metaboliti cellulari di individui normali nelle stesse condizioni metaboliche, e quindi bisogna assumere che i meccanismi di regolazione che determinano i flussi della via metabolica abbiano capacità tali da aggiustare le possibili differenze di velocità di reazioni risultanti dai diversi valori di C_{ss}.

Quindi la normalità metabolica di un certo tipo di cellula, in una determinata condizione metabolica, non risulterebbe da una normale concentrazione di tutti i metaboliti cellulari, ma da una normale velocità di sintesi di prodotti

finali.

La selezione naturale deve aver favorito i meccanismi di regolazione a feed-back, che rispondendo a variazioni delle C_{ss} di prodotti finali, aggiustano la velocità della via metabolica di sintesi di un prodotto con quella della via metabolica di utilizzazione dello stesso prodotto.

In questo modo, le possibili differenze di velocità delle reazioni enzimatiche di una stessa via metabolica, che risultano in differenze nelle C_{ss} dei metaboliti intermedi in cellule dello stesso tipo ma appartenenti ad individui diversi, compensano le une con le altre. Questo meccanismo di compensazione appare ancora più importante se si considera che le C_{ss} dei metaboliti dipendono dall'attività totale degli enzimi che catalizzano le reazioni di una via metabolica. Quindi differenze nella concentrazione e/o di attività di uno stesso enzima in cellule dello stesso tipo ma appartenenti ad individui diversi, vengono compensati, entro certi limiti, attraverso la regolazione da effettore. Quando l'alterazione macromolecolare (concentrazione e/o attività) è tale da non poter essere compensata dal sistema di regolazione, si ha alterazione (eccesso o carenza) permanente dell'attività metabolica e quindi di una o più funzioni cellulari.

Un meccanismo di compensazione delle variazioni delle proprietà dei singoli elementi che sono associati ad un'unica funzione, è stato riscontrato nella valutazione della emmetropia. L'emmetropia è quello stato di rifrazione dell'occhio in cui, senza accomodazione, i raggi paralleli (oggetto posto all'infinito) vengono portati a fuoco sullo strato sensibile della retina. L'emmetropia, che è la condizione per una visione normale, risulta da una giusta proporzione tra lunghezza assiale dell'occhio e potere di rifrazione della cornea e del cristallino. Analisi di questi elementi ottici in molti individui umani, hanno mostrato che i valori dei singoli elementi ottici variano da un individuo all'altro, e che l'emmetropia risulta dalla compensazione tra gli elementi ottici piuttosto che da valori standard (uguali in tutti gli occhi umani) per ogni elemento ottico. Se non ci fosse compensazione tra gli elementi ottici, cioè se l'associazione dei singoli elementi ottici fosse casuale, nella popolazione umano, le deviazioni dell'emmetropia sarebbero maggiori.

Ritornando al metabolismo, si può ipotizzare che individui capaci di prestazioni fuori della norma, come i campioni nello sport, abbiano le attività metaboliche di base che richiedono la minore compensazione da parte della regolazione. La regolazione sarebbe utilizzata solo e totalmente per aggiustare l'attività metabolica alle richieste eccezionali dell'esercizio sportivo.

Appendice 2: Turnover e riparazione

Tutte le cellule hanno turnover eccetto: neuroni, fibre muscolari cardiache, cellule del Sertoli, odontoblasti dei molari.

Tipi diversi di cellule hanno tempi di turnover diversi.

Tutti i componenti cellulari hanno turnover eccetto il DNA

di tutte le cellule, Hb e le altre proteine dei globuli rossi non hanno turnover perchè i globuli rossi durante il differenziamento hanno perso molte attività metaboliche. I fosfolipidi di membrane dei globuli rossi hanno turnover perchè vengono sostituiti con quelli liberi nel plasma. Il tempo di turnover dei componenti cellulari è in genere inferiore a quello delle cellule in cui sono inclusi, ed è diverso per specie molecolari diverse.

Tutti i componenti cellulari sono sottoposti a modificazioni covalenti e/o a denaturazione per azione di radiazioni, reagenti inquinanti, reazioni accidentali con composti cellulari, errori di sintesi ed incorporazione di analoghi dei substrati.

Per eliminare e/o ripristinare le molecole o macromolecole difettose, la cellula ha due sistemi:

Riparazione della macromolecola o della molecola costituente una struttura sopramolecolare. Esiste la riparazione del DNA (più meccanismi), della Hb-ossidata, dei gruppi -SH ossidati delle proteine, degli acidi grassi perossidati dei P-lipidi di membrana.

-Turnover di ripulitura (scavenger): macromolecole difettose sono preferenzialmente degradate perchè strutturalmente alterate (parzialmente o totalmente denaturate, modificate covalentemente). Successivamente, le macromolecole sono risintetizzate al fine di mantenere costante la loro C_{ss}. Il turnover cellulare: elimina le cellule difettose (e vecchie), es. globuli rossi e con essi le eventuali macromolecole danneggiate.

Esistono altri tre tipi di turnover:

1) di regolazione, per avere un'azione rapida e rapidamente reversibile occorre che le molecole effettori di regolazione abbiano un rapido turnover (es. ormoni). Regolazione da cicli futili.

2) da dieta, durante il digiuno si degradano proteine, lipidi, carboidrati, ed acidi nucleici (mRNA, rRNA) che vengono risintetizzati con la rialimentazione.

3) di adattamento, nuove molecole di enzima sono sintetizzate o cessano di esserlo, rispettivamente per attivazione o repressione dei relativi geni, al fine di rispondere a definite condizioni metaboliche (alimentazione, digiuno, sforzo muscolare prolungato, riposo, particolari alimentazioni). Inoltre molecole di enzimi impegnate nel metabolismo, cioè associate al substrato ed al coenzima, sono più resistenti alle proteasi, essendo degradate più lentamente aumentano in concentrazione. Enzimi non impegnati nel metabolismo, cioè non associati al substrato o al coenzima, sono degradati più rapidamente e tendono a diminuire in concentrazione.

Fig. 7-1

Schema della regolazione da effettori del sistema glicolisi-ciclo di Krebs-fosforilazione ossidativa in cellule di mammifero (uomo) operata da ATP, da nucleotidi originati dall'utilizzazione dell'ATP (ADP, AMP) e dai metaboliti effettori (G6P, Acetil-CoA). Le concentrazioni allo stato stazionario (Css) di questi effettori decresce (ADP, AMP) ed aumenta (G6P, Acetil-CoA) con l'incremento della Css di ATP.

L'ATP ha effetti inibitori diretti (---) su gli enzimi CS, α KGDH, PDH, PC, effetti indiretti conseguenti all'incremento della Css-ATP (...) via Acetil-CoA, ed effetti indiretti conseguente al decremento della Css-ATP (-.-.-) via ADP ed AMP. L'AMP è capace di rimuovere l'inibizione dell'ATP su FFC ($\rightarrow \leftarrow$).

L'enzima PDH è inibito mediante fosforilazione e la PDH-cinasi è attivata da ATP e da altri metaboliti (fig. 7-9c). Quindi, l'ATP non è un attivatore diretto della PDH, tuttavia in questa figura il termine diretto indica non mediato da altri metaboliti effettori.

- 1) solo nel fegato; 2) solo nel fegato e rene;
- 3) fegato, rene, muscolo.

L'aumento della Css dell'ATP, ha sul sistema glicolisi-ciclo di Krebs-fosforilazione ossidativa (GLI-CIK-PO) solo effetti inibitori e solo sugli enzimi regolati dal catabolismo glucidico, cioè glicogenolisi, glicolisi, ciclo di Krebs.

Sulla fosforilazione ossidativa l'ATP ha una azione inibitoria indiretta, cioè è per sottrazione di ADP, substrato della via stessa. La concentrazione totale (pool) dei nucleotidi adenilici (ATP, ADP, AMP) varia poco, mentre le concentrazioni relative, se la Css-ATP è alta, la Css-ADP e Css-AMP sono basse. Css-ATP alta corrisponde ad uno stato di scarsa utilizzazione di ATP da parte della cellula.

L'ADP è l'unico regolatore della fosforilazione ossidativa perchè la Css-Pi è sempre in eccesso per far procedere la P-ossidativa, il NADH è sempre rifornito in quantità sufficienti. L'O₂ può essere un fattore limitante (es. insufficiente apporto), ma non è un regolatore fisiologico della fosforilazione ossidativa. Ciò è anche dedotto dal fatto che quando l'apporto di O₂ è insufficiente per produrre l'ATP necessario alla cellula, causa un rallentamento della fosforilazione ossidativa e quindi della sintesi aerobica di ATP, ed automaticamente causa sintesi anaerobica di ATP. L'O₂ quindi non può essere considerato un modulatore della P-ossidativa perchè l'ATP è prodotto ugualmente ed in maniera meno efficiente.

L'azione inibitoria dell'ATP sulla fosfofruttocinasi (FFC) ha come conseguenza l'aumento della Css-G6P e quindi l'inibizione dell'esocinasi e della glicogeno fosforilasi-b. Questi effetti sono minori quando il G6P è utilizzato per la sintesi del glicogeno e/o per lo shunt dei pentosi (perchè la Css-G6P aumenta meno). Poichè il G6P attiva la glicogeno sintetasi-b, l'innalzamento della Css-G6P favorisce la conversione del glucosio in glicogeno, piuttosto che la sua entrata nello shunt dei pentosi. Se l'ATP è utilizzato più velocemente di quanto sia prodotto la sua Css si abbassa leggermente e ciò è sufficiente per rimuovere gli effetti

inibitori sugli enzimi indicati, con il conseguente incremento della glicogenolisi, glicolisi da glucosio ematico, ciclo di Krebs. L'abbassamento della C_{ss}-ATP porta ad un incremento della C_{ss}-ADP che attiva il ciclo di Krebs agendo come effettore positivo sulla isocitrico deidrogenasi (IDH) e come substrato sulla fosforilazione ossidativa. L'utilizzazione dell'ATP porta ad un incremento della C_{ss}-AMP via la reazione adenilato-cinasica (ACi), che mette in relazione le C_{ss} di ATP, ADP ed AMP. L'AMP è capace di rimuovere l'azione inibitrice dell'ATP su FFC. Ciò può realizzarsi per una maggiore affinità dell'AMP verso FFC, dato che la C_{ss}-AMP è in genere molto più bassa della C_{ss}-ATP anche quando la cellula utilizza molto ATP (es. fibre muscolari in contrazione). Dato che la C_{ss}-AMP è sempre inferiore alla C_{ss}-ATP appare importante che l'effetto attivatorio dell'AMP sia associato alla rimozione di quello dell'ATP, altrimenti l'azione dell'AMP avrebbe scarso effetto.

L'AMP favorisce la glicogenolisi e la glicolisi, attivando la glicogeno fosforilasi-b e la FFC.

L'incremento della C_{ss}-AMP non è solo un segnale di carenza di ATP, ma indica anche che la produzione di ATP deve avvenire velocemente e se necessario anche per via anaerobica. Ciò è dedotto dal fatto che l'AMP attiva la glicogenolisi e la glicolisi, ma non ha effetti sul ciclo di Krebs. In queste condizioni, se non c'è carenza di O₂, il ciclo di Krebs è completamente attivo perchè la C_{ss}-ATP è bassa e la C_{ss}-ADP alta, ed è attiva la P-ossidativa.

Tuttavia, se la richiesta di ATP è superiore a quella che la glicolisi aerobica può dare, viene attivata la glicolisi anaerobica e gli effetti dell'AMP vanno in questa direzione. In un organo come il fegato, che produce aerobicamente l'ATP che gli occorre, l'azione regolatrice da AMP deve avere una importanza nelle condizioni in cui si ha una minore pO₂ arteriosa ed una attiva gluconeogenesi (es. prolungato digiuno od attiva neolipogenesi). Si ipotizza che se nel fegato la C_{ss}-ATP si abbassi oltre un certo valore, la C_{ss}-AMP aumenta ed attiva la glicolisi, ed inibisce la gluconeogenesi agendo sulla F_{1,6}diP fosfatasi (evita così il ciclo futile). In questo modo la C_{ss}-ATP aumenta rapidamente e la C_{ss}-AMP diminuisce, e la gluconeogenesi riprende.

La C_{ss}-AMP nel fegato appare come un segnale di allarme che entra in funzione per ripristinare rapidamente la C_{ss}-ATP scesa ad un livello basso, che non può attivare ulteriormente per disinibizione la FFC. Quindi si è instaurato un meccanismo che non può portare a riformare rapidamente ATP se non interviene l'azione regolatrice dell'AMP. L'attivazione della glicogenolisi da AMP ha la funzione di realizzare il meccanismo di ripristino della C_{ss}-ATP anche in condizioni in cui l'apporto di glucosio dal sangue non sia sufficiente (es. bassa glicemia).

Nel tessuto muscolare la glicolisi anaerobica ha un ruolo importantissimo. Produce ATP, nelle condizioni in cui le contrazioni richiedono più ATP di quello che può essere prodotto in aerobiosi, perchè l'apporto di O₂ alle fibre muscolari è insufficiente. Queste condizioni includono:

- 1) Inizio delle contrazioni delle fibre. L'apporto di O₂ è insufficiente perchè la circolazione del sangue, che portava

la quantità di O_2 sufficiente alle fibre nelle condizioni di riposo, è insufficiente per alimentare la sintesi di ATP nelle fibre in contrazione; ed occorrono circa 10 minuti per aggiustarsi alle richieste. 2) Contrazioni veloci, che richiedono più ATP di quello che può essere fornito aerobicamente anche con la circolazione del sangue portata ai massimi valori.

3) Contrazioni isometriche, il muscolo rimane contratto e fermo, per cui i vasi rimangono compressi impedendo la circolazione del sangue e quindi l'apporto di O_2 . (Vedere figg. 7-19, 7-21 e 7-22). Si ritiene che nelle 3 condizioni indicate l'AMP svolga l'importante funzione di rendere l'enzima FFC meno sensibile all'inibizione dell'ATP.

La glucocinasi, enzima esclusivamente epatico, ha la funzione di eliminare dal sangue l'eccesso di glucosio. In relazione a questa funzione, la glucocinasi non è inibita da ATP al fine di metabolizzare il glucosio ematico anche con Css -ATP alta. Il glucosio è sempre presente nel sangue, si ammette che negli epatociti il G6P si formi continuamente da glucosio e che venga defosforilato dalla G6P fosfatasi (G6P-asi) se non viene metabolizzato per la sintesi di ATP e/o di glicogeno e/o di acidi grassi. Poiché esiste sempre una Css -G6P, c'è sempre una continua riconversione di G6P in glucosio.

Glucosio e G6P sono substrati di un ciclo. L'inibizione sull'esocinasi può rallentare la velocità di questo ciclo, ma non del tutto a causa della glucocinasi. Questo ciclo è regolato dai valori relativi della velocità di utilizzazione dei due substrati. Se il G6P è metabolizzato rapidamente si ha la sintesi netta di G6P anche se una frazione è riconvertita in glucosio; se G6P è in eccesso ed il glucosio è scarso, prevale la sintesi netta di glucosio da G6P.. Occorre tener presente che la glucocinasi, a differenza dell'esocinasi, ha un alto valore di K_m , per cui la sua attività catalitica è significativa solo quando il glucosio cellulare è alto, in genere in conseguenza di un'alta glicemia (fig. 7-4). Mentre, l'esocinasi è sempre saturata da glucosio anche in condizioni di ipoglicemia fisiologica, è regolata da G6P.

Quando la Css -ATP è alta, l'inibizione della PDH (enzima già inibito da ATP) da parte dell'acetil-CoA (la cui Css aumenta a causa dell'inibizione dell'ATP sulla CS) appare superflua perché, per semplicità, non sono state indicate le vie di sintesi da acidi grassi ed aminoacidi dell'acetil-CoA.

L'inibizione della PDH da acetil-CoA ha la funzione di rallentare la conversione del piruvato in acetil-CoA, indipendentemente dai livelli di ATP, quando l'acetil-CoA è prodotto per altre vie (vedere figg. 7-2, 7-5, 7-8).

L'inibizione da ATP della α KG-DH ha la funzione di regolare il ciclo di Krebs, in particolare quando l' α KG è prodotto da glutamato per azione della GDH e delle transaminasi, cioè quando l' α KG è prodotto da aminoacidi.

Il valore della Css -ATP indica la velocità di utilizzazione dell'ATP stesso. I valori alti corrispondono alla velocità fisiologica minima di utilizzazione di ATP e quelli bassi alla velocità fisiologica massima di utilizzazione di ATP.

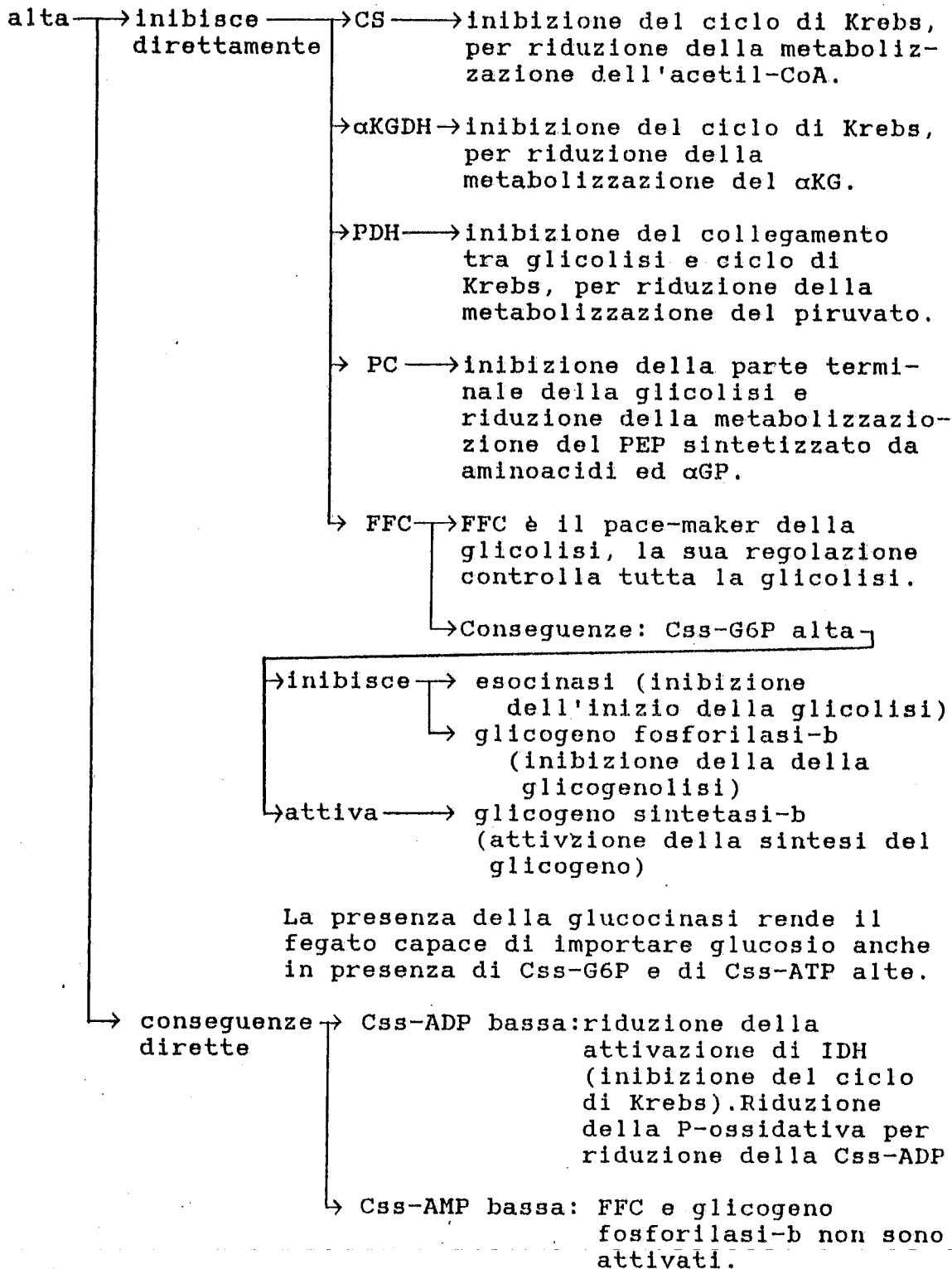
L'abbassamento della Css -ATP conseguente ad una maggiore velocità di utilizzazione dell'ATP, è il segnale che attiva

il meccanismo molecolare di regolazione della sintesi di ATP. Il paradosso che un abbassamento della C_{ss}-ATP sia in relazione diretta alla sua utilizzazione, quando sappiamo che le reazioni procedono più velocemente quando il reagente è in eccesso, è spiegato considerando che gli enzimi che utilizzano ATP sono saturati, o comunque sono massimalmente attivi, anche alle C_{ss}-ATP sub-massime, e che la maggiore o minore utilizzazione di ATP dipende dai meccanismi di regolazione (da effettore ed ormonale) degli enzimi delle vie metaboliche dove è utilizzato l'ATP, piuttosto che dalla C_{ss}-ATP stessa.

Appendice alla fig. 7-1

Sommario della funzione dell'ATP.

Css-ATP Il suo valore indica la velocità di utilizzazione dell'ATP. I valori alti corrispondono alla velocità fisiologica minima di utilizzazione di ATP e quelli bassi alla velocità fisiologica massima di utilizzazione di ATP.



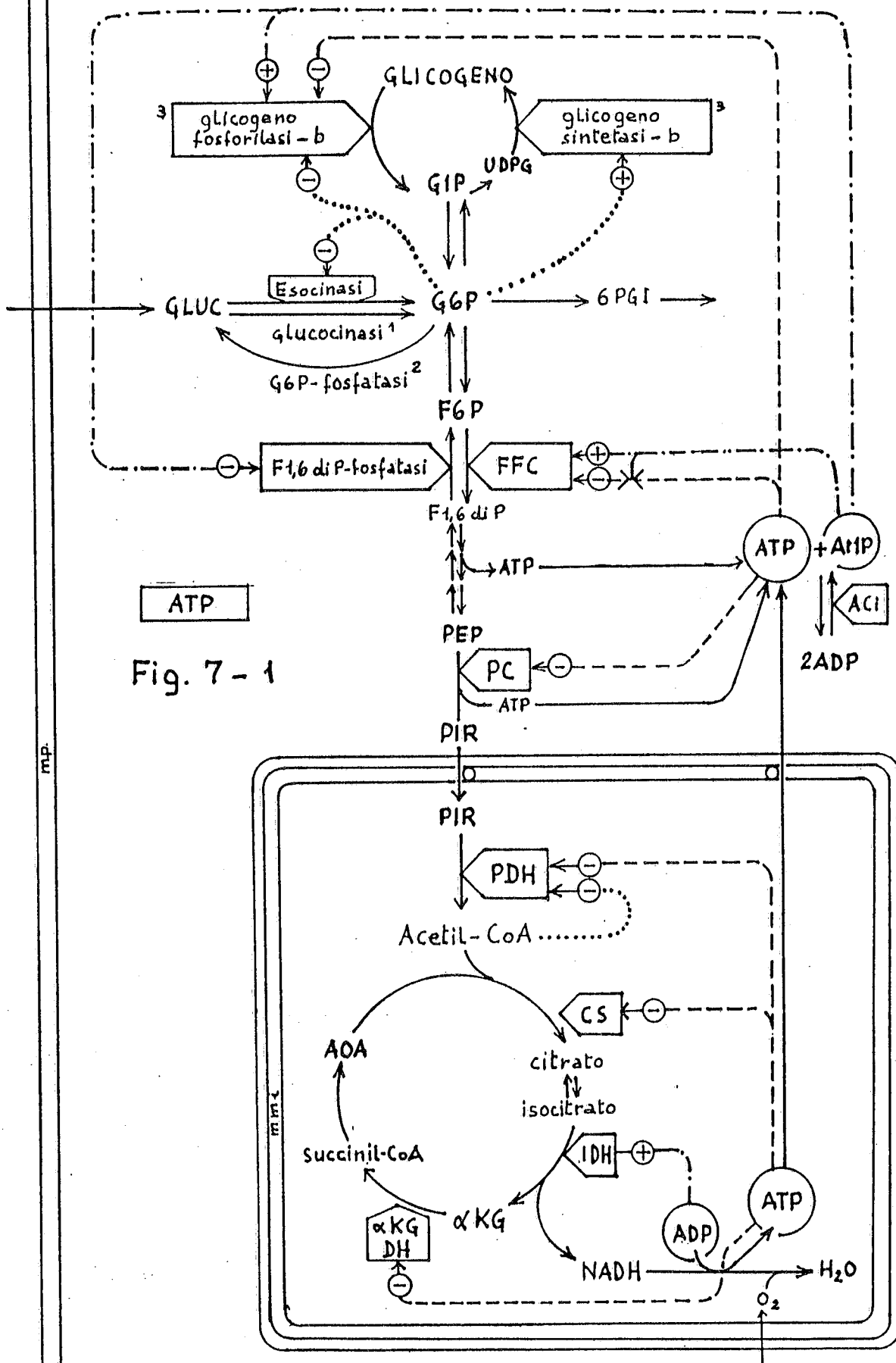


Fig. 7 - 1

Fig. 7-2

Schema della regolazione da effettori del sistema glicolisi-ciclo di Krebs-fosforilazione ossidativa, in cellule di mammifero (uomo), operata da NADH e da metaboliti effettori (G6P, citrato, acetil-CoA), le concentrazioni dei quali aumentano in seguito all'aumento della concentrazione del NADH.

Il NADH ha effetti di regolazione (allosterici) diretti solo su enzimi mitocondriali del metabolismo energetico. Il NADH ha effetti inibitori diretti (---) sulla IDH e sulla α KGDH, enzimi del ciclo di Krebs, e sulla piruvato deidrogenasi (PDH). Il NADH ha effetti inibitori indiretti (...) sull'enzima PDH con l'acetil-CoA e con il citrato sull'enzima CS del ciclo di Krebs e sulla FFC. L'inibizione delle FFC a sua volta causa l'incremento della C_{ss}-G6P, che inibisce l'esocinasi, la glicogeno fosforilasi-b, ed attiva la glicogenosintetasi. La PDH è un enzima regolato mediante fosforilazione (inattivazione) e defosforilazione (attivazione). La proteina cinasi che catalizza la fosforilazione è attivata da NADH e da altri metaboliti (vedere fig. 7-9c). Quindi in senso stretto il NADH non sarebbe un inibitore che interagisce direttamente sulla PDH, ma qui il termine diretto è utilizzato per indicare che l'azione del NADH non è mediata dall'azione di metaboliti effettori, la cui C_{ss} è aumentata in conseguenza dell'inibizione del NADH su un enzima.

In tutte le cellule le inibizioni operate dal NADH direttamente sugli enzimi del ciclo di Krebs, hanno la funzione di coordinare la formazione del NADH con la sua ossidazione nella P-ossidativa. Le C_{ss}-NADH alte rallentano il ciclo e quindi la formazione di altre NADH, le basse C_{ss}-NADH favoriscono la sua formazione in modo che il ciclo di Krebs sia opportunamente accoppiato con la P-ossidativa. In tutte le cellule le inibizioni indirette del NADH hanno la funzione principale di rallentare la glicolisi e glicogenolisi, al fine di risparmiare glucosio e/o la riserva di glicogeno.

L'eccesso fisiologico di NADH può essere prodotto in almeno tre condizioni metaboliche:

1) β -ossidazione funzionante per produrre ATP alle velocità richieste dal metabolismo del momento.

Gli acidi grassi, essendo molecole con scarso contenuto di O₂, producono più coenzimi ridotti del glucosio, inoltre circa 1/3 dei coenzimi ridotti sono prodotti intramitocondrialmente per mezzo di reazioni non del ciclo di Krebs. Ciò può favorire la formazione una C_{ss}-NADH relativamente alta che inibisce l'enzima IDH, il quale causa un incremento della C_{ss}-isocitrato ed a sua volta quella del citrato. Il citrato esce dai mitocondri ed inibisce l'enzima FFC provocando il rallentamento della glicolisi. Questo meccanismo non è presente nelle cellule del sistema nervoso che non operano la β -ossidazione perchè la barriera emato-encefalica è impermeabile agli acidi grassi. Tuttavia, in condizione di digiuno si ha un forte incremento della C_{ss}-corpi chetonici, composti utilizzati dalle cellule del sistema nervoso. L'utilizzazione dei corpi chetonici, anche nel tessuto nervoso, porta alla riduzione della

utilizzo di glucosio provocando il rallentamento della glicolisi, si ritiene mediante l'effetto del citrato con il meccanismo di regolazione sopra indicato.

Nel tessuto muscolare, il meccanismo di regolazione (inibizione della glicolisi durante la β -ossidazione) è operante al massimo nelle fibre in riposo e nelle fibre in contrazione con frequenze inferiori alla soglia anaerobica (vedere figg. 7-20, 7-22 e 7-25).

Nel fegato, l'effetto di massima inibizione della glicolisi e PDH, si ha durante la gluconeogenesi, al fine di potere realizzare la sintesi netta di glucosio. Per questa azione occorre che negli epatociti sia molto attiva la β -ossidazione da acidi grassi endogeni e/o da acidi grassi provenienti dal tessuto adiposo, al fine di mantenere la Css-NADH mitocondriale costantemente alta. La presenza di una alta Css-NADH mitocondriale è dedotta dal fatto che la gluconeogenesi epatica appare strettamente associata alla sintesi dei corpi chetonici. Uno corpo chetonico, acido idrossi-butyrico (AIB) è prodotto dall'altro, acido aceto-acetico (AAA), per riduzione NADH dipendente. La sintesi di AIB da AAA indica la disponibilità di NADH mitocondriale in eccesso rispetto alle necessità energetiche (sintesi di ATP) dell'epatocita.

2) Glicemia alta.

L'epatocita, essendo dotato di glucocinasi non inibita da ATP, importa il glucosio dal sangue e lo trasforma in G6P anche in quantità superiori a quelle delle sue necessità energetiche, perché il G6P in eccesso si equilibria con il F6P. Il F6P è un attivatore dell'enzima F6P e la sua Css aumenterà fino a rimuovere parzialmente l'inibizione di ATP. L'incremento di attività fa aumentare la Css-F1,6diP che attiva la PC e può rimuovere l'inibizione da ATP sulla PC. In queste condizioni il piruvato prodotto attiva l'enzima PDH e rimuove (se presente) l'inibizione da ATP, NADH ed acetil-CoA. Si assume che l'eccesso di NADH sia causato dalla metabolizzazione del glucosio in eccesso rispetto alle esigenze energetiche dell'epatocita segnalate dalla Css-ATP con le inibizioni su FFC e PC. Come sopra indicato, queste inibizioni sono parzialmente rimosse dai metaboliti prodotti dal glucosio. L'alta Css-NADH mitocondriale inibisce l'IDH, causa accumulo di citrato che esce nel citoplasma. Il citrato è inibitore della FFC. Tuttavia nel citoplasma trova le condizioni di regolazione per essere utilizzato nella sintesi degli acidi grassi (vedere fig. 7-3). Se il citrato è utilizzato per la sintesi degli acidi grassi, la sua Css nel citoplasma si mantiene bassa, e l'effetto inibitorio sulla FFC è ridotto proprio perché la glicolisi alimenta contemporaneamente la sintesi di ATP e di acidi grassi. La sintesi di acidi grassi costa energia, così viene utilizzato ATP e prodotto ADP.

L'incremento della Css-ADP fa utilizzare più NADH che favorisce l'utilizzazione del citrato nel ciclo di Krebs. La riduzione della Css-citrato mitocondriale fa diminuire anche la Css-citrato citoplasmatica, così la FFC risulta disinibita da ATP e da citrato; ciò porterà più acetil CoA al ciclo da favorire l'innalzamento della Css-NADH. Queste variazioni vanno avanti fino a quando tutte le velocità delle vie metaboliche coinvolte si aggiustano

opportunamente. Infatti, gli effetti inibitori sulla glicolisi, PDH e ciclo di Krebs operati dal ATP, Acetil-CoA, citrato, NADH, sono mitigati per riduzione delle C_{ss} degli effettori (ATP, Acetil-CoA, citrato e NADH) ogni volta che questi stessi metaboliti sono utilizzati per alimentare la sintesi degli acidi grassi. Quindi i loro effetti di inibizione hanno la funzione di disciplinare l'utilizzazione del glucosio in relazione alle esigenze energetiche e sintetiche del momento.

L'inibizione delle FFC da ATP e citrato ha la funzione di coordinare l'utilizzazione di glucosio con la richiesta di energia da parte della cellula (coordinata dall'ATP) e della trasformazione del glucosio in eccesso (non utilizzato per la sintesi di ATP) in acidi grassi (coordinata dal citrato). L'eccesso di glucosio e la conseguente glicolisi non causano un eccesso di acetil-CoA come avviene durante una attiva β ossidazione degli acidi grassi, perchè l'acetil-CoA è convogliato per mezzo del citrato nella sintesi degli acidi grassi, che non ha limitazioni perchè gli acidi grassi sono esportati dal fegato. Il NADH (a differenza dell'ATP, fig. 7-1) non ha effetti diretti su enzimi citoplasmatici, ma agisce per mezzo del citrato.

Nell'epatocita, in condizioni di disponibilità di acidi grassi (β -ossidazione attiva) e carenza di glucosio, l'alta C_{ss}-NADH causa la sintesi dei corpi chetonici che esporta, ed il risparmio di glucosio (inibizione della glicolisi); se è disponibile il glucosio, l'epatocita sintetizza acidi grassi e trigliceridi (neolipogenesi) che esporta. Quindi l'eccessivo apporto di glucosio trova una via di eliminazione come lipidi (fig. 7-3), l'eccesso di lipidi è eliminato come corpi chetonici (fig. 7-5).

La regolazione da ATP appare sovrapposta a quella del NADH, ma è anche gerarchicamente più importante perchè può regolare, via la C_{ss}-ADP, il flusso di NADH e quindi la C_{ss}-NADH. Cioè se la C_{ss}-ATP si abbassa, in ogni tipo di cellula, provoca l'aumento della velocità metabolica della glicolisi e ciclo di Krebs e, per incremento della C_{ss}-ADP, anche della P-ossidativa. L'incremento della P-ossidativa causa il decremento della C_{ss}-NADH. Tuttavia l'alta C_{ss}-ATP "per se" non favorisce al massimo la sintesi di acidi grassi, si assume che ciò possa avvenire se ad essa è associata un'alta e costante C_{ss}-NADH mitocondriale capace di inibire la IDH e provocare l'incremento, e quindi l'esportazione del citrato dal mitocondrio. Si assume che con C_{ss}-ATP alte e le conseguenti C_{ss}-ADP basse, l'attività IDH non sia sufficientemente alta per mantenere alte C_{ss}-NADH, se non c'è un eccesso di apporto di glucosio (vedere fig. 7-3).

3) Apporto di O₂ insufficiente per la produzione di ATP richiesta dal metabolismo cellulare.

Questa condizione è tipica delle fibre muscolari in contrazioni rapide quando l'apporto di O₂ è insufficiente ad ossidare tutto il NADH necessario per sintetizzare l'ATP necessario per le contrazioni. Ciò causa un incremento della C_{ss}-NADH ed una riduzione della C_{ss}-ATP (figg. 7-19, 7-21, 7-22). Quindi si ha un incremento della glicolisi senza che il piruvato prodotto possa essere tutto metabolizzato, perchè la PDH è inibita da NADH ed acetil-CoA anche se

l'inibizione da ATP su questo enzima è scarsa o non è presente, data la bassa C_{50} -ATP. Il piruvato in eccesso è eliminato come lattato al fine di rigenerare il NADH citoplasmatico e permettere l'avvenire della reazione GAL-DH, e l'ATP per le contrazioni veloci è prodotto con la glicolisi anaerobica. Si ritiene che la condizione di insufficiente apporto di O_2 per le normali esigenze metaboliche non si verifica nelle cellule degli altri tessuti se non in casi patologici (ostruzione dei vasi) o per mancanza di O_2 nell'aria.

Appendice alla fig. 7-2

Sommario della funzione del NADH mitocondriale (NADHm).

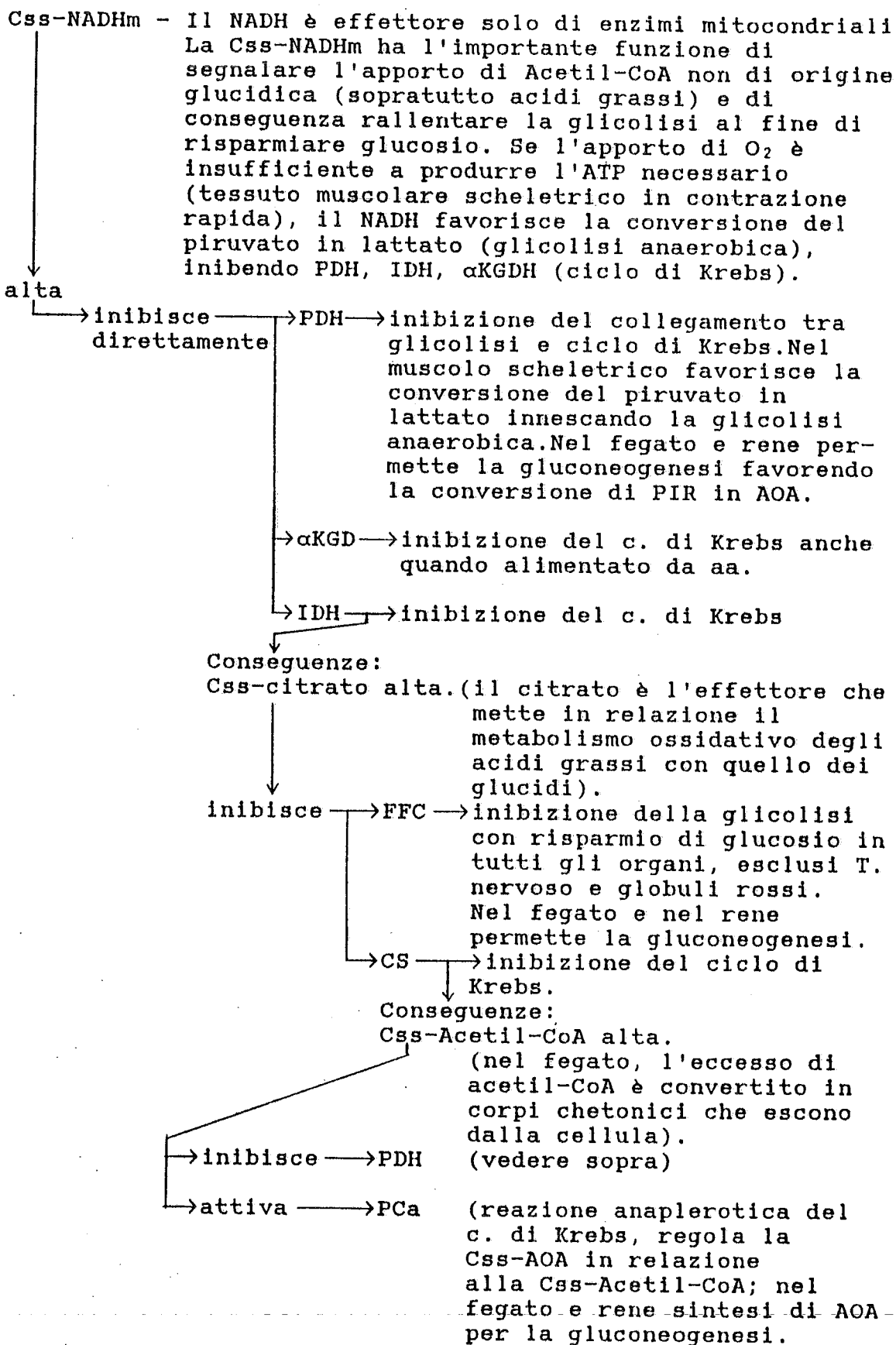


Fig. 7-2

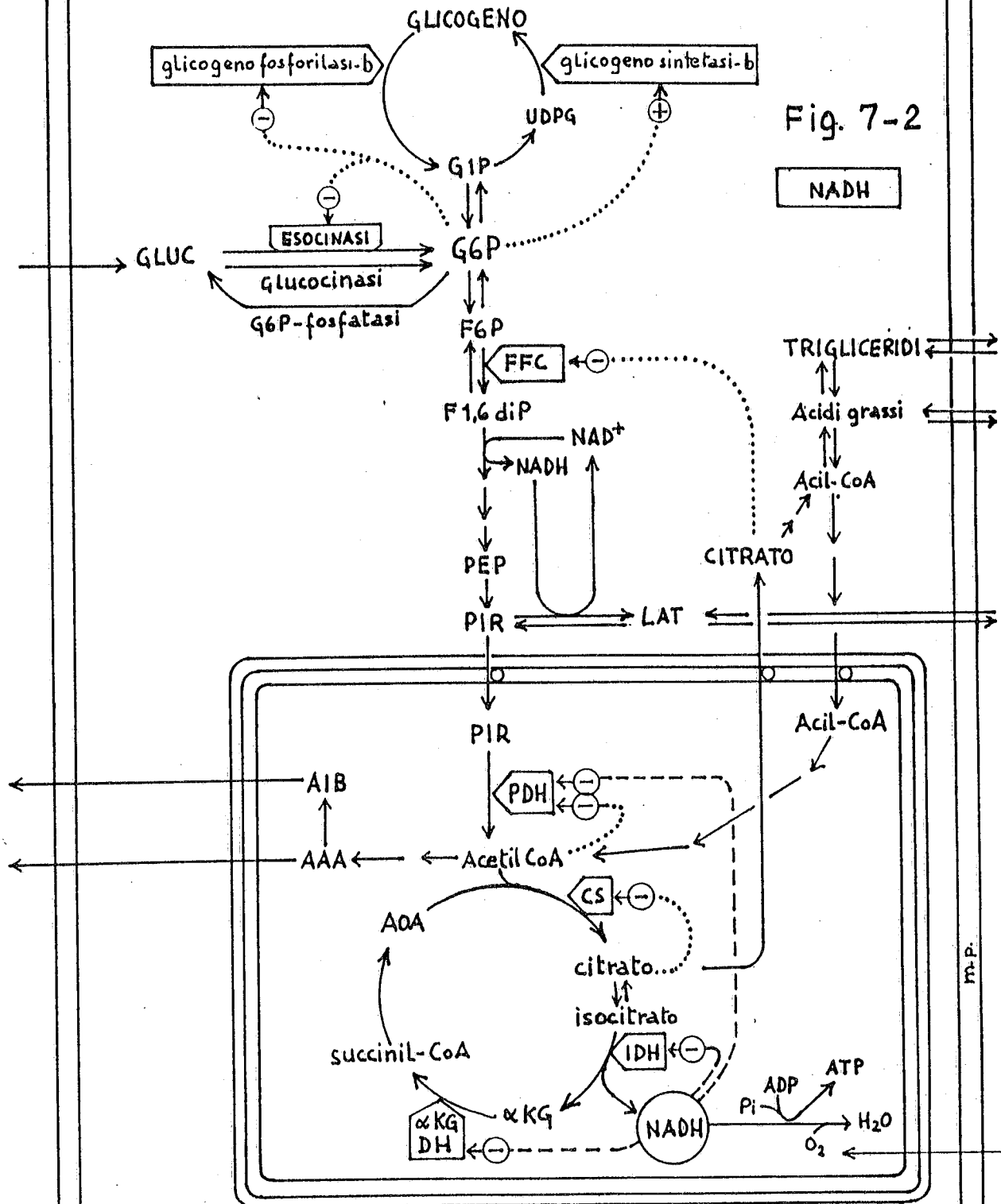


Fig. 7-3

Schema della regolazione da substrato e da effettore del sistema glicolisi-ciclo di Krebs-fosforilazione ossidativa nel fegato di mammifero (uomo) alimentato solamente con carboidrati ed in eccesso rispetto alle necessità energetiche del fegato e dell'organismo.

In eccesso rispetto alle necessità energetiche vuol dire che gli alimenti introdotti determinano processi di sintesi nel fegato e/o nell'organismo.

Frecce continue grosse = reazioni enzimatiche di vie metaboliche che procedono con alta velocità.

Frecce continue sottili = reazioni enzimatiche e vie metaboliche che procedono a bassa velocità.

Frecce tratteggiate grosse = regolazione da effettore molto attiva (implica una alta C_{ss} dell'effettore).

Frecce tratteggiate sottili = regolazione da effettore poco attiva. Può risultare da una bassa C_{ss} dell'effettore o da una C_{ss} dell'effettore sufficiente ad influenzare l'enzima, ma l'azione dell'effettore è rimossa o antagonizzata da altri effettori di segno opposto.

L'eccesso fisiologico di glucosio nel sangue è determinato da una alimentazione con dolci, pane, patate, pasta. Questi alimenti contengono anche piccole quantità di proteine e lipidi, mentre nello schema in figura per semplicità, si considera che l'apporto calorico sia di carboidrati puri (saccarosio, glucosio).

Una parte del glucosio che entra nell'epatocita viene utilizzato per produrre l'ATP (via la GLI-CIK-PO) necessario per le esigenze metaboliche del momento. In qualsiasi condizione metabolica la sintesi dell'ATP ha la precedenza su qualsiasi altra via metabolica perchè è regolata dalla C_{ss}-ATP. La glicolisi può essere fortemente rallentata da eccessi di NADH mitocondriale (fig. 7-2) che ha la funzione di far risparmiare glucosio, tuttavia questa regolazione non è attiva nella condizione in figura, dove il glucosio è in eccesso (vedere dopo) e rappresenta l'unico metabolita esogeno disponibile. Se l'organismo che si alimenta proviene da un periodo di digiuno, nella prima fase il G6P viene utilizzato prevalentemente per la sintesi del glicogeno, e successivamente per la sintesi degli acidi grassi e trigliceridi. Le due sintesi sono concomitanti e le loro velocità relative sono diverse nel tempo.

Con la disponibilità di glucosio si ha una velocità di sintesi di ATP più che sufficiente a sostenere le esigenze energetiche della cellula, la C_{ss}-ATP aumenta e causa l'inibizione della FFC. Il conseguente eccesso di G6P favorisce la sintesi netta di glicogeno (attiva la glicogeno sintetasi b, ed inibisce la glicogeno fosforilasi b). Il glucosio-6P inibisce l'esocinasi, ma non ha effetto sulla glucocinasi, per cui il G6P è sintetizzato continuamente da glucosio dato l'alto livello (fisiologico) della glicemia. La glucocinasi è presente solo nel fegato (e nelle cellule β del pancreas (vedere figg. 7-9+7-13) e l'enzima ha una attività massima /g T.F. che è 4-6 volte maggiore dell'esocinasi presente nelle stesse cellule. La glucocinasi

ha un alto valore di K_m per il glucosio (circa 10 mM) (fig. 7-4), per cui l'attività dell'enzima è regolata da substrato e varia in relazione al variare della concentrazione del glucosio nell'epatocita, che a sua volta dipende dal valore della glicemia. Il contenuto di glucosio nella vena epatica portale, passa da valori di 4 mM del digiuno di 1 giorno a 10-12 mM dopo un pasto ricco di carboidrati. Queste variazioni di concentrazione di glucosio fanno variare la velocità della glucocinasi da valori del 25% al 50% della sua attività massima. L'esocinasi ha un basso valore della K_m (0,01-0,1 mM) per il glucosio, per cui è saturata da glucosio anche in condizioni di bassa glicemia ed è sempre molto attiva se non è inibita dal G6P.

La glucocinasi è meno attiva dell'esocinasi, ma nel fegato è più concentrata di questa, per cui le attività relative dei due enzimi sono, in condizioni di ipoglicemia da digiuno (circa 4 mM glucosio nelle vene): esocinasi 1 e glucocinasi 2-2,5 e nell'iperglicemia dopo un pasto glucidico (10 mM glucosio): esocinasi 1 e glucocinasi 4-5. Questi valori sono stati calcolati considerando che i due enzimi siano uniformemente distribuiti in un g di tessuto epatico. Dati più recenti indicano che l'esocinasi sia principalmente localizzata nelle cellule dei dotti biliari, cellule reticolo-istiocitarie e cellule dei vasi, mentre la glucocinasi sarebbe presente solo nelle cellule epatiche. Le cellule epatiche avrebbero così un rapporto glucocinasi/esocinasi di circa 10/1 che rispecchia la funzione di regolazione della glicemia da parte di queste cellule.

I due enzimi hanno ruoli diversi nella cellula epatica: l'esocinasi garantisce la sintesi di G6P per la sintesi di ATP, la sua attività non è regolata da substrato ma dalla C_{ss}-G6P che a sua volta dipende dalla C_{ss}-ATP e quindi dallo stato energetico della cellula. La glucocinasi svolge la sua funzione per la regolazione della glicemia in stati di iperglicemia fisiologica, e quindi associa il glucosio e catalizza la sua conversione a G6P in relazione diretta alla concentrazione del glucosio, e non in relazione alle esigenze energetiche cellulari, perchè non è regolata da effettori.

Le attività dei due enzimi non sono in contrasto fra loro: se la glicemia è bassa ed i due enzimi sintetizzano G6P ad una velocità sufficiente per le esigenze metaboliche, il G6P viene tutto utilizzato per la sintesi di ATP; se la velocità di sintesi di ATP è eccessiva, si ha l'inibizione della FFC, che causa l'incremento della C_{ss}-G6P e quindi l'inibizione dell'esocinasi e conseguente riduzione nella sintesi di G6P. Se l'inibizione dell'esocinasi è insufficiente a limitare la sintesi del G6P, il G6P è utilizzato in altra via metabolica o viene riconvertito in glucosio per azione della G6P-fosfatasi.

In condizioni di iperglicemia fisiologica si ha un incremento della C_{ss}-G6P. In questa condizione, l'esocinasi degli epatociti è inibita, e ciò rende la sintesi di G6P dipendente dai valori della glicemia perchè essa è operata solamente dalla glucocinasi. L'alta C_{ss}-G6P stimola la sintesi del glicogeno e causa un incremento della C_{ss}-F6P attraverso la reazione all'equilibrio nelle condizioni

cellulari, catalizzate dalla fosfoglucoisomerasi. L'incremento della C_{ss}-F6P fa aumentare la velocità della reazione FFC per regolazione da substrato e da effettore, ed in questo modo viene incrementata la velocità della glicolisi. Se ci sono degli effetti inibitori sulla PC (da ATP, da Acetil-CoA o da Ala) essi sono rimossi per azione del F1,6diP prodotto da FFC stimolata dal F6P.

Il piruvato prodotto attiva la PDH (come substrato ed effettore positivo) rimuovendo, se presenti, le inibizioni da ATP e NADH. Il piruvato e così gli altri effettori, non agiscono direttamente sulla PDH, ma sull'enzima PDH-cinasi che fosforila la PDH rendendola poco attiva. ATP, NADH e Acetil-CoA attivano la PDH-cinasi e quindi causano l'inibizione della PDH, il piruvato inibisce l'enzima e quindi favorisce l'accumularsi della PDH non fosforilata che è attiva (fig. 7-9c).

L'acetil-CoA alimenta il ciclo di Krebs con due principali finalità: produrre ATP e citrato. Il citrato fuoriesce dal mitocondrio, attiva l'acetil-CoA-carbossilasi (ACC) e così stimola la sintesi degli acidi grassi che sono esportati dalla cellula, o come tali, o dopo essere stati convertiti in trigliceridi.

Si assume che nel mitocondrio il livello del NADH sia sufficientemente alto da permettere una parziale inibizione della IDH e favorire la fuoriuscita del citrato, senza che questo provochi una eccessiva inibizione della CS. La C_{ss}-NADH mitocondriale dipende dalla C_{ss}-ATP che, se è sufficientemente alta, fa rallentare la fosforilazione ossidativa per riduzione della C_{ss}-ADP, causando un incremento di NADH che porta all'inibizione delle IDH. Anche la riduzione della C_{ss}-ADP causa, per riduzione di attivazione, un decremento dell'attività IDH.

L'inibizione da NADH della α KGDH, in parallelo a quella della IDH, ha la funzione di mantenere, nella parte del ciclo di Krebs che va da isocitrico a malato, una velocità di flusso sufficiente a produrre l'ATP occorrente per il metabolismo dell'epatocita (principalmente la sintesi di acidi grassi). Quindi i due enzimi sono inibiti da ATP se la C_{ss}-ATP aumenta, cioè se per qualche motivo la sintesi di acidi grassi rallenta e l'ATP viene utilizzato meno velocemente. L'inibizione da NADH di questa parte del ciclo permette una più veloce conversione di glucosio in acidi grassi. Infatti l'acetil-CoA è convertito in citrato che passa nel citoplasma, si riforma acetil-CoA che alimenta la sintesi degli acidi grassi, mentre l'AOA è convertito in malato. Il malato ha due possibilità di eludere (by-pass) la parte del ciclo di Krebs che procede a più lenta velocità (per l'inibizione da NADH della IDH e α KGDH). La prima è quella di entrare nel mitocondrio ed essere riconvertito in AOA ed alimentare la parte del ciclo metabolicamente più veloce. La seconda è quella di essere trasformato in piruvato (mediante la reazione catalizzata dall'enzima malico) e quindi in acetil-CoA; con questa reazione viene prodotto anche NADPH che è utilizzato per la sintesi degli acidi grassi.

Con i meccanismi di inibizione e di by-pass sopra indicati, il ciclo è regolato in modo da avere due parti di esso con due diverse velocità: una parte utilizzata solo per la

sintesi di ATP (a minor flusso), l'altra per la sintesi di ATP e per la trasformazione di acetil-CoA in citrato (a maggior flusso). Sarebbe sufficiente l'inibizione da ATP e NADH della IDH per operare l'opportuna regolazione del ciclo se l' α KG non fosse anche il metabolita di ingresso degli aminoacidi nel ciclo di Krebs. Si assume che la regolazione dell' α KGDH abbia la funzione di evitare che il flusso del ciclo di Krebs, rallentato dalla IDH, venga rialimentato da α KG prodotto dalla GDH.

Nel citoplasma, il citrato trova la via della sua utilizzazione nella sintesi degli acidi grassi. Il citrato viene di nuovo scisso in Acetil-CoA che è il primo substrato per la sintesi degli acidi grassi, mentre l'AOA torna nel mitocondrio sottoforma di acido malico (MAL). Si assume che nel citoplasma la C_{ss}-citrato abbia un valore tale da stimolare l'ACC ma da non inibire massivamente la FFC, ed inoltre che l'effetto inibitorio del citrato sia in parte rimosso da quello del F6P. L'azione del citrato può divenire importante quando la sintesi degli acidi grassi rallenta, ed in questo modo viene rallentata la glicolisi. In questa ipotesi la C_{ss}-citrato coordinerebbe la velocità della glicolisi con quella della sintesi degli acidi grassi (attivando l'una ed inibendo l'altra).

Una certa inibizione da ATP della FFC è sempre presente al fine di mantenere la glicolisi dipendente dalla C_{ss}-ATP (fig. 7-1); in queste condizioni è anche richiesta (l'azione del citrato può contribuire) per mantenere la C_{ss}-G6P sufficientemente alta da favorire l'utilizzazione del G6P nello shunt dei pentosi e produrre NADPH per la sintesi degli acidi grassi. Nel fegato il NADPH è anche prodotto nella reazione dell'enzima malico, tuttavia in quantità minore rispetto allo shunt dei pentosi. Anche una parziale inibizione della PC da ATP ed Acetil-CoA, deve essere presente al fine di provocare un incremento della C_{ss} di idrossi acetone-fosfato (diOHAP) e quindi favorire la sua conversione in α -glicerofosfato (α GP). L' α GP è substrato della sintesi dei trigliceridi che stimola con regolazione da substrato: in questo modo l' α GP favorisce la conversione del glucosio in lipidi (neolipogenesi).

Anche in queste condizioni di eccesso di apporto calorico sottoforma di glucosio, la cellula è regolata dalla C_{ss}-ATP e quindi dal consumo di ATP nell'unità di tempo. Tuttavia in queste condizioni metaboliche, il sistema di regolazione da effettori deve far fronte ad immissioni di glucosio eccessive per le necessità energetiche della cellula. Il sistema di regolazione epatico può disciplinare questo accesso, ma non evitarlo, per la presenza della glucocinasi, enzima non regolato da effettori. Le cellule di altri tessuti, non avendo la glucocinasi, inibiscono l'esocinasi, ed in questo modo limitano l'utilizzazione del glucosio alle loro necessità energetiche del momento.

Il fegato, organo deputato alla regolazione della glicemia, risponde trasformando l'eccesso di glucosio in molecole di deposito: in glicogeno ed in trigliceridi.

Per coordinare queste vie metaboliche, gli effetti inibitori dell'ATP rimangono presenti sugli enzimi del sistema Gli-CIK-PO epatico; tuttavia questi effetti vengono parzialmente rimossi dall'eccesso di glucosio che entrando

nella cellula causa un incremento della C_{ss}-G6P e quindi gli effetti allosterici descritti sopra. Questi effetti permettono: il procedere della glicolisi in condizioni di C_{ss}-ATP relativamente alte da permettere la sintesi dei trigliceridi, la conversione dell'acetil-CoA e NADPH in acidi grassi, del diOH-AP in α GP, e di questi composti neosintetizzati in trigliceridi. Gran parte degli acidi grassi neosintetizzati è esportata dal fegato nel tessuto adiposo, dove gli acidi grassi verranno utilizzati per la sintesi dei trigliceridi.

Gli acil-CoA neosintetizzati non sono degradati nella cellula stessa, perchè il malonil-CoA inibisce la ACT-I ed impedisce l'entrata degli acidi grassi nel mitocondrio dove sono localizzati gli enzimi della β -ossidazione.

Il glucosio ha un'azione inibitoria sulla degradazione del glicogeno, che è una integrazione tra la regolazione da effettore metabolita e quella ormonale. Il glucosio favorisce la conversione dell'enzima glicogeno fosforilasi-a (attiva) nella forma b (poco attiva), ed in questo modo inibisce la degradazione del glicogeno (vedere fig. 7-9).

Concludendo:

la GLI-CIK-PO e la sintesi degli acidi grassi sono regolate e coordinate dalla C_{ss}-ATP e da C_{ss}-citrato. Infatti se il glucosio viene metabolizzato in acetil-CoA e poi in CO₂ ed H₂O più velocemente di quanto l'acetil-CoA venga convertito in acidi grassi, si ha un incremento della C_{ss}-ATP che rallenta la glicolisi e quindi la formazione di acetil-CoA, in modo che la velocità di sintesi di acetil-CoA sia uguale a quella della sua conversione in acidi grassi ed all'utilizzazione di ATP per la sintesi degli acidi grassi stessi. Se avviene il contrario, sintesi degli acidi grassi più veloce della formazione dell'acetil-CoA, si ha un decremento della C_{ss}-ATP che fa aumentare la velocità della sintesi di acetil-CoA e di ATP.

L'azione dell'ATP, che è sulla base dello stato energetico della cellula (rappresentato dalla C_{ss}-ATP), è affiancata da quella del citrato, che piuttosto che al controllo energetico della glicolisi e sintesi degli acidi grassi, è diretta alla coordinazione del flusso di glucosio in citrato, e di questo in acidi grassi, ed a quello di glucosio in NADH. Poichè l'azione di regolazione dell'ATP comprende anche questo aspetto e la regolazione di altre sintesi, l'azione dell'ATP ha un carattere più generale. La regolazione da ATP predomina su tutte le regolazioni perchè è legata dall'energia. La regolazione da citrato della glicolisi-sintesi di acidi grassi, risulta predominante in condizioni in cui la C_{ss}-ATP è costante ed a livelli sufficienti a sostenere la sintesi degli acidi grassi e di altre sintesi del momento.

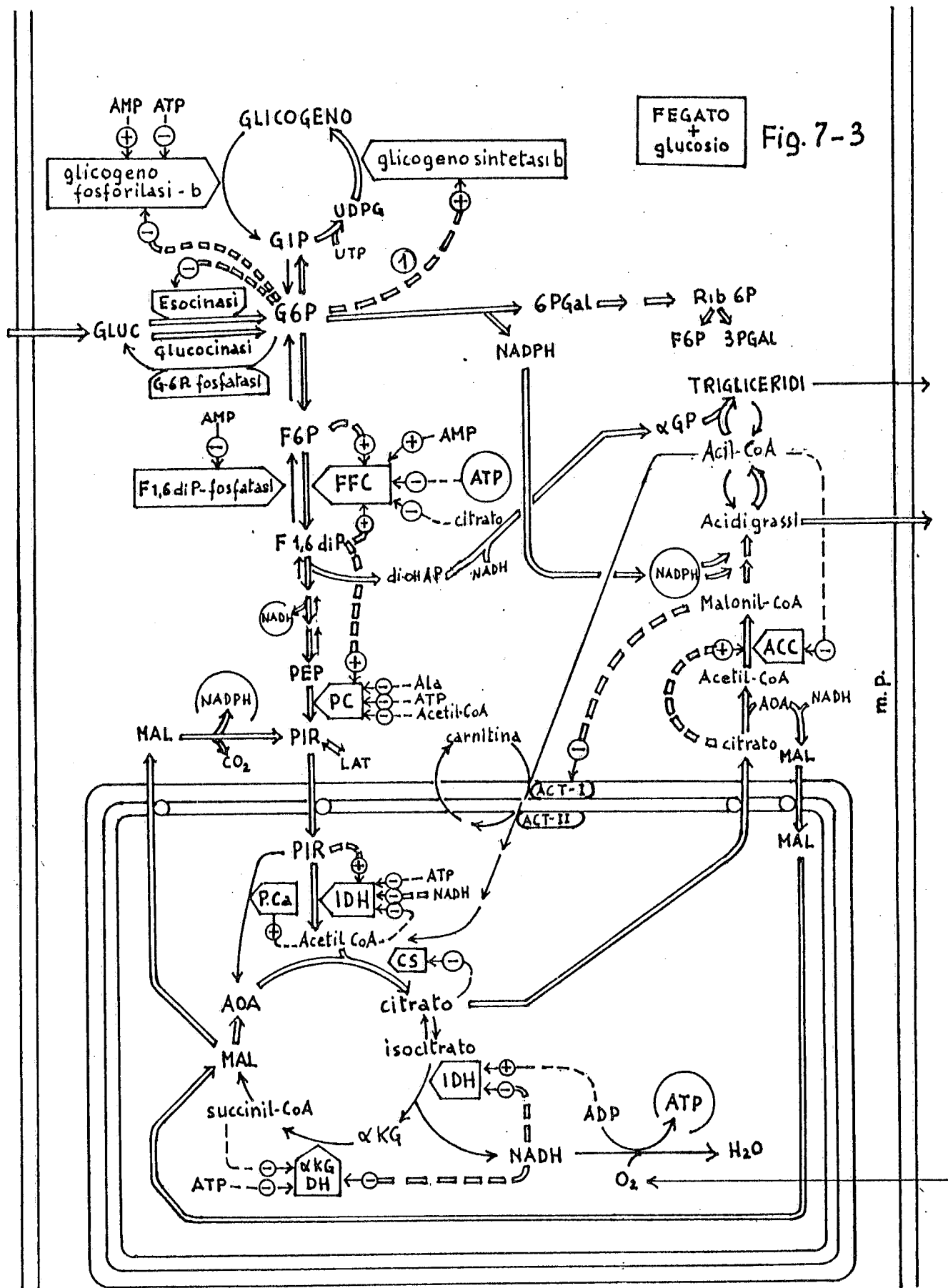


Fig. 7-4

Variazione della velocità iniziale delle reazioni catalizzate dall'esocinasi e glucocinasi in funzione della concentrazione del substrato.

Nell'ambito della variazione fisiologica della concentrazione del glucosio nella vena epatica porta: l'esocinasi non varia la sua attività catalitica che rimane vicina al valore della velocità massima (V_{max}), mentre la glucocinasi passa dal valore 25% della V_{max} nella ipoglicemia fisiologica (4 mM glucosio), al 50% della V_{max} della iperglicemia fisiologica (10 mM). La glucocinasi ha una attività massima per g di fegato 4-6 volte maggiore dell'esocinasi, inoltre l'attività esocinasica nella cellula è inferiore a quella dosata per la costante presenza del G6P che inibisce l'enzima. Nel fegato, in condizioni di ipoglicemia fisiologica, l'attività della esocinasi è il 40-50% della attività della glucocinasi, ed in condizioni di iperglicemia il 20-25%. Alcuni esperimenti indicano che la glucocinasi sia presente solo negli epatociti e che il rapporto dei contenuti di glucocinasi ed esocinasi negli epatociti sia uguale a 10/1. Anche le esocinasi degli altri tipi di cellule (non irrorate dal sistema portale epatico) sono saturate costantemente dal glucosio in condizioni di alti e bassi livelli fisiologici di glicemia.

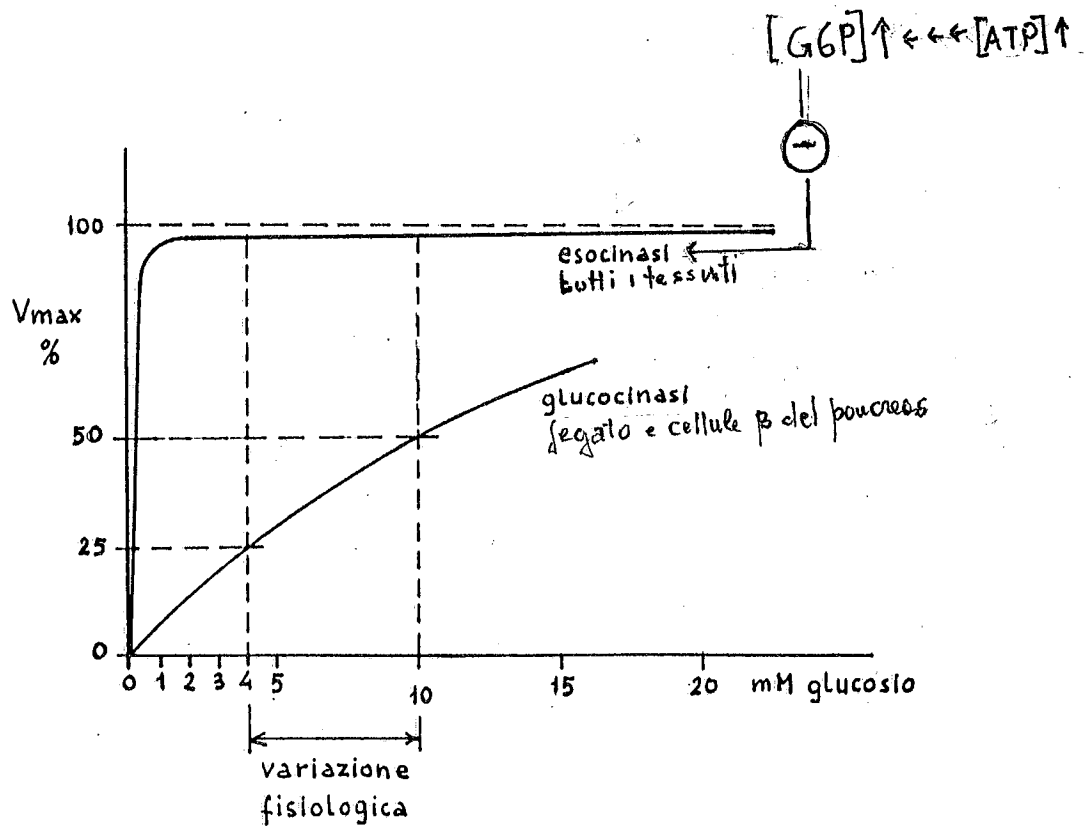


Fig. 7-4

Fig. 7-5

Schema della regolazione da substrato e da effettore del sistema glicolisi-ciclo di Krebs-fosforilazione ossidativa nel fegato di mammifero (uomo) che utilizza a fini energetici trigliceridi ed acidi grassi introdotti in eccesso rispetto alle richieste energetiche del fegato e dell'organismo.

Questa condizione metabolica è sperimentale, ed è improbabile che si verifichi con una normale alimentazione dato che si dovrebbero ingerire solamente grassi animali (strutto, burro, panna, latte) o vegetali (olio, margarina). Lo scopo della analisi di questa condizione è di chiarire l'utilizzazione dei grassi a fini energetici.

Si assume che in queste condizioni, la sintesi di ATP avvenga esclusivamente da acidi grassi, i quali sono trasformati in acetil-CoA ed alimentano il ciclo di Krebs, e questo la fosforilazione ossidativa. L'utilizzazione di acidi grassi per la sintesi di ATP è in relazione alla richiesta energetica e alla disponibilità di O_2 . Quando la C_{ss}-ATP è ottimale (la velocità di sintesi e di utilizzazione dell'ATP sono uguali) nei valori fisiologici alti, il NADH è prodotto in eccesso, la C_{ss}-NADH è relativamente alta e causa una costante e parziale inibizione della PDH, della IDH e delle α KGDH. L'inibizione della IDH mantiene una C_{ss}-citrato relativamente alta, il citrato esce dal mitocondrio e si accumula nel citoplasma aumentando l'inibizione della FFC già inibita da ATP. Il citrato nel citoplasma può essere utilizzato per la sintesi di acidi grassi (fig. 7-3), ma non in questa condizione metabolica dove la cellula degrada gli acidi grassi per produrre ATP. Infatti l'attivazione della acetil-CoA carbossilasi (ACC) da parte del citrato, è contrastata dall'inibizione degli acil-CoA sullo stesso enzima che prevale su quella del citrato. Eventuali incrementi di C_{ss}-malonil-CoA provocano inibizione della ACT-I. Questa inibizione provoca un rallentamento dell'entrata degli acil-CoA nel mitocondrio e quindi un incremento della C_{ss}-acil-CoA che inibisce ulteriormente la ACC. Un rallentamento dell'utilizzazione di acil-CoA porta ad una utilizzazione di citrato mitocondriale la cui C_{ss} calerà nel mitocondrio e poi nel citoplasma, causando una riduzione dell'attivazione della ACC.

L'inibizione della ACC causa un incremento della C_{ss}-acetil-CoA citoplasmatica che inibisce la PC in accordo con l'inibizione da citrato delle FFC. Una eventuale piccola formazione di malonil-CoA porterebbe alla sintesi di acidi grassi e quindi di acil-CoA che causano l'inibizione della sintesi di altri acidi grassi, essendoci già un eccesso di acil-CoA e di trigliceridi.

ATP e NADH non hanno effetti allosterici diretti o indiretti su enzimi della β ossidazione, e l'eventuale accesso di acetil-CoA prodotto, viene convertito in corpi chetonici, acetoacetato (AAA) e β OH-Butirrato (AIB). AIB è anche un mezzo per esportare NADH. Le reazioni di deidrogenazione che usano come coenzima il NAD^+ o NADP e che avvengono senza decarbossilazione (sono quindi escluse G6PDH, PHD, IDH e

α KGDH), sono all'equilibrio stazionario nella cellula e possono procedere facilmente nei due sensi. Poichè l'AAA è prodotto in grande quantità e continuamente esportato, la produzione di AIB, mediante una reazione all'equilibrio allo stato stazionario, AIB deidrogenasi, indica la disponibilità (veloce produzione) di NADH mitocondriale. In particolare sono i valori relativi della C_{ss}-AAA e C_{ss}-AIB che indicano la maggiore disponibilità di NADH mitocondriale, ed in relazione alla C_{ss}-NADH sarà prodotto più o meno AIB rispetto a AAA.

I corpi chetonici sono esportati dal mitocondrio e dalla cellula epatica, e sono usati dai tessuti extraepatici come substrati per la sintesi di ATP, determinando così un risparmio di glucosio. L' α GP liberato dall'idrolisi dei trigliceridi, può essere utilizzato per alimentare la glicolisi, ma può anche essere convertito in glucosio, se la sintesi di ATP è ottimale e la glicemia è bassa, oppure in glicogeno. In condizioni di alimentazione di soli lipidi, la glicemia tende a decrescere, per cui, quasi certamente, l' α GP sarà convertito in glucosio per mantenere la glicemia. Nonostante l'inibizione simultanea da ATP e da citrato, la reazione FFC procede, anche se lentamente, perchè l'enzima non è mai completamente inibito. Il F₁,6diP è riconvertito in F6P dalla F6P-fosfatasi (figg. 5-7 e 7-23). Inoltre, eventuali incrementi di utilizzazione di ATP che causino decrementi della C_{ss}-ATP nel citoplasma, trovano risposta rapida solo in una disinibizione della FFC perchè la βossidazione non essendo regolata da effettori, non può essere attivata rapidamente.

L'eventuale inibizione da acetil-CoA sulla PC è rimossa dal F₁,6diP. Inoltre abbassamenti della C_{ss}-ATP mitocondriale, portano a riduzioni della C_{ss}-NADH e quindi della C_{ss}-citrato mitocondriale e poi citoplasmatica. Quindi una utilizzazione di ATP che sia maggiore della sua stessa sintesi, risulta nella disinibizione (dal citrato ed ATP) della FFC, che risulta in un incremento rapido della glicolisi e non della βossidazione, nonostante la disponibilità di acidi grassi.

La βossidazione è regolata da substrato, cioè dalla disponibilità degli acidi grassi nel citoplasma, che dipende dalla concentrazione di acidi grassi nel sangue. La diffusione degli acidi grassi dal sangue nelle cellule è lenta ed occorre un gradiente di 1000 ad 1. Nel citoplasma gli acidi grassi sono subito convertiti in acil-CoA, che è la forma metabolicamente attiva (per degradazione e sintesi) degli acidi grassi. Gli acil-CoA penetrano all'interno del mitocondrio per gradiente, trasportati dalla carnitina, e per intervento di due enzimi, acil-carnitina transferasi I e II, posti rispettivamente sulle facce esterna ed interna della membrana mitocondriale interna.

Nel mitocondrio gli acil-CoA subiscono la βossidazione che produce coenzimi ridotti ed acetil-CoA, che entra nel ciclo di Krebs.

Un rallentamento nella utilizzazione degli acidi grassi avviene quando tutto il CoA mitocondriale si trova sottoforma di acil-CoA e di acetil-CoA, perchè l'acetil-CoA non è metabolizzato con sufficiente rapidità nel ciclo di Krebs (se inibito da eccesso di ATP e NADH) e nella sintesi

dei corpi chetonici. L'incremento della C_{ss}-acil-CoA mitocondriale fa rallentare il flusso (via carnitina) di acil-CoA dal citoplasma per carenza di CoA. Ciò causa un incremento della C_{ss}-acil-CoA citoplasmatica con la conseguenza che la quasi totalità di CoA si trova sottoforma di acil-CoA. La C_{ss}-acidi grassi aumenta nel citoplasma (perchè gli acidi grassi non sono convertiti in acil-CoA per carenza di CoA) facendo rallentare il flusso netto degli acidi grassi dal sangue verso la cellula.

La regolazione della utilizzazione degli acidi grassi, essendo da substrato e coinvolgendo due compartimenti cellulari, è lenta ed inefficiente a rispondere a rapide variazioni di C_{ss}-ATP.

Anche in queste condizioni metaboliche (grande disponibilità di acidi grassi) la C_{ss}-ATP è responsabile della regolazione della sintesi di ATP, anche se la molecola ATP non è effettore di regolazione della βossidazione. Questo perchè la glicolisi, sulla quale l'ATP agisce direttamente, è l'unica via capace di rispondere a rapide variazioni di utilizzazione di ATP. Quindi, per qualsiasi ragione la βossidazione produca Acetil-CoA con velocità insufficiente ad alimentare il ciclo di Krebs, in relazione al consumo di ATP del momento, l'abbassamento della C_{ss}-ATP attiva la glicolisi, e l'Acetil-CoA, mancante per una opportuna sintesi di ATP, viene prodotto da glucosio.

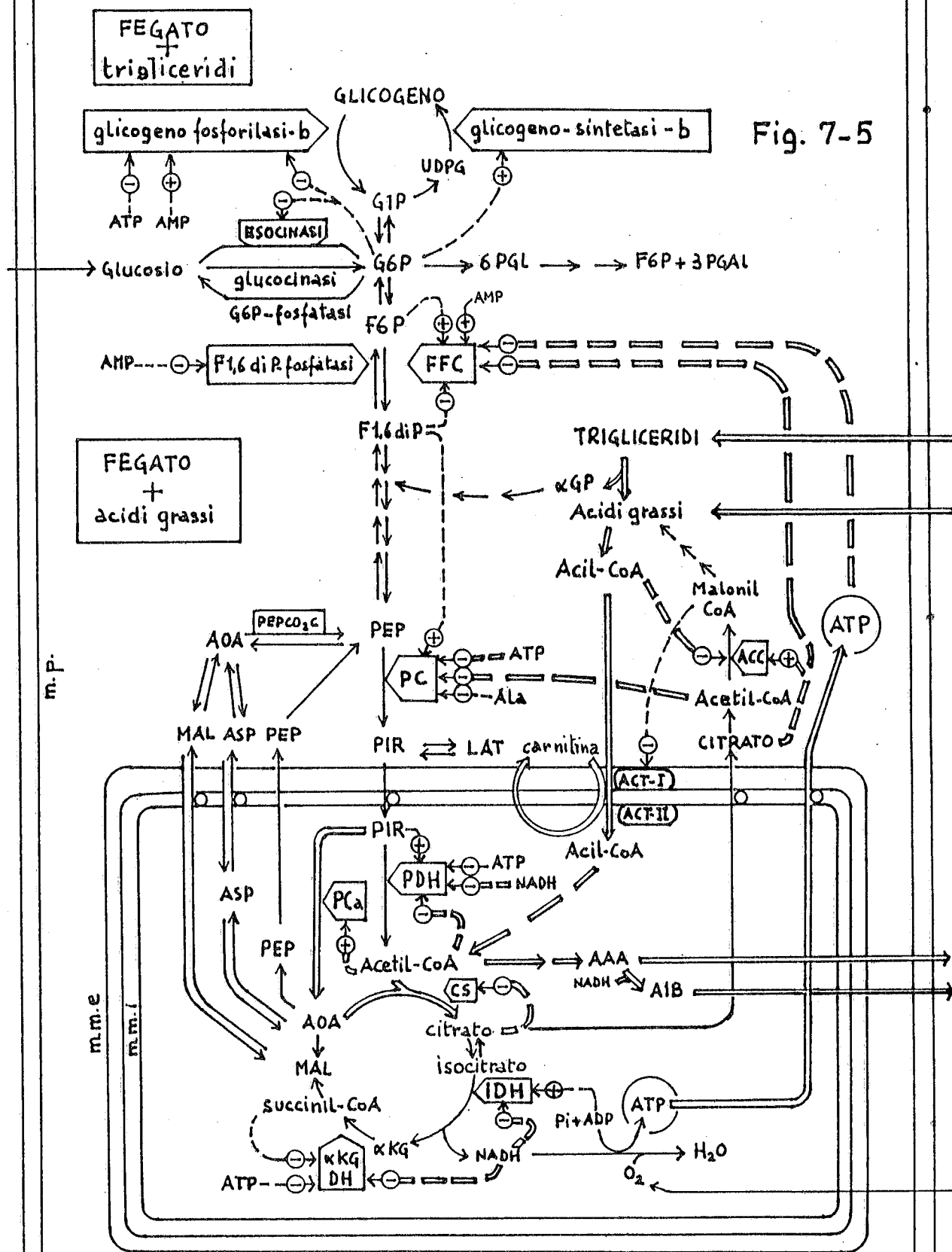


Fig. 7-6

Regolazione da substrato e da effettore del sistema glicolisi-ciclo di Krebs-fosforilazione ossidativa nel fegato di mammifero (uomo) che utilizza a fini energetici solo aminoacidi.

Questa è una condizione sperimentale che corrisponde all'ingestione di sola carne o pesce prive di grassi, ed è qui usata allo scopo di mostrare come si possa sintetizzare ATP utilizzando solo aminoacidi. Gli aminoacidi convergono su intermedi della glicolisi e ciclo di Krebs, quindi le loro molecole (private dei gruppi aminici ed anche del solfo della cisteina e metionina) producono coenzimi ridotti che alimentano la fosforilazione ossidativa. Gli aminoacidi convertibili in intermedi del ciclo di Krebs, per essere completamente utilizzati a fini energetici (sintesi di ATP) devono essere convertiti in metaboliti a tre atomi di carbonio. Nel citoplasma e mitocondrio del fegato umano, esiste l'enzima fosfoenolpiruvato carbossicinasasi (PEPCO₂ cinasi) che converte l'ossalacetato (AOA) in fosfoenolpiruvato (PEP) che a sua volta è convertibile in acetil-CoA. Tutti gli aminoacidi che sono convertiti in intermedi del ciclo di Krebs, sono convertibili in AOA e quindi in PEP e poi in Acetil-CoA. In questo modo gli aminoacidi sono completamente utilizzabili per produrre energia perchè trasformabili in H₂O e CO₂.

Ad eccezione dell'alanina che inibisce la piruvato cinasi, gli aminoacidi non hanno effetti sugli enzimi del sistema GLI-CIK-PO. La regolazione di questo sistema è dipendente esclusivamente dalle C₅-ATP con gli effetti diretti ed indiretti indicati in fig. 7-1.

La possibile inibizione della PC da alanina è rimossa dal Fl,6diP (vedere fig. 7-3) se la FFC venisse disinibita per riduzione della C₅-ATP, cioè per una insufficiente sintesi di ATP da aminoacidi.

La regolazione a fini energetici degli aminoacidi è prevalentemente da substrato. Le reazioni di transaminazione (convertono gli aminoacidi in chetoacidi, quindi in composti utilizzabili a fini energetici) sono reazioni all'equilibrio. Quindi in condizioni di richiesta rapida di ATP, l'incremento della sintesi di ATP può avvenire solo per disinibizione della FFC, utilizzando glucosio perchè l'utilizzazione degli aminoacidi non può essere incrementata per attivazione degli enzimi.

Un collegamento tra metabolismo ossidativo degli aminoacidi e velocità di sintesi di ATP, è data dall'effetto di attivazione della ADP sulla glutamato deidrogenasi (GDH). La reazione GDH è particolare perchè è all'equilibrio ed è regolata da effettori (vedere Cap. 5); essa assolve all'importante funzione di liberare il gruppo α -NH dagli aminoacidi. La maggior parte degli aminoacidi perde il gruppo aminico cedendolo (mediante la reazione di transaminazione) all' α -chetoglutarato (α KG) che diviene acido glutamico (GLU). Inoltre l' NH_3 ceduto dagli aminoacidi mediante reazioni non di transaminazione (desaminazioni), può reagire con l' α KG mediante la reazione GDH che procede in senso riduttivo utilizzando NADH come coenzima. L'acido

glutamico prodotto è trasformato di nuovo in α KG mediante la reazione GDH che è NADH dipendente e localizzata nel mitocondrio.

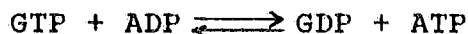
Quindi, regolando la GDH si regola l'ingresso nel metabolismo ossidativo (perdita del gruppo aminico) degli aminoacidi. Infatti, nella cellula le reazioni di transaminazione sono all'equilibrio allo stato stazionario. Se il GLU prodotto via transaminasi non viene continuamente deaminato a α KG (la GDH è l'unica possibilità), non procedono, e se la C_{ss}-Glu aumenta, procedono in senso opposto.

La richiesta di una più rapida sintesi di ATP, indicata da una C_{ss}-ADP alta, attivando la GDH fa incrementare la velocità del ciclo di Krebs, rifornendolo di intermedi. La GDH si comporta come una reazione anaplerotica. Inoltre l' α KG può essere convertito in acetil-CoA (vedi sopra) e contribuire alla produzione di NADH e quindi di ATP.

Tuttavia la GDH catalizza una reazione che è all'equilibrio, e quindi la sua azione è limitata dai livelli delle C_{ss} dei singoli aminoacidi. In altre parole, pur essendo regolato da effettore, la GDH dipende dai valori relativi della C_{ss} dei substrati (GLUT, NAD⁺) e dei prodotti (α KG, NADH e NH₃). In particolare, affinché la reazione GDH sia attivata velocemente per fini energetici, occorre la coincidenza di una opportuna regolazione da effettore ed una alta disponibilità di glutamato.

La GDH è anche inibita da GTP. Questa inibizione può avere la funzione di rallentare l'ingresso di aminoacidi nel ciclo quando il GTP è in eccesso, eccesso che è associato ad un eccesso di ATP:

se GTP è in eccesso può reagire con ADP e convertirlo in ATP. Nella cellula, la reazione è all'equilibrio allo stato stazionario.



Tuttavia, quando la C_{ss}-ATP è alta, si ha una bassa C_{ss}-ADP, per cui il GTP non trovando accettore (ADP) mantiene un'alta C_{ss}. Quindi un'alta C_{ss}-GTP, come un'alta C_{ss}-ATP, indica una condizione energetica ottimale. Il GTP è utilizzato nella reazione PEPCO₂-cinasi (che è regolata da substrato), nella sintesi proteica e dalle proteine G che fanno parte del meccanismo molecolare di regolazione di alcuni ormoni e fattori di crescita. Un'alta C_{ss}-GTP può avere più di un significato in relazione alla condizione metabolica. Nella condizione indicata in questa figura, l'eccesso di GTP inibisce la conversione degli aminoacidi in intermedi del ciclo (mediante l'inibizione della GDH) e favorisce la loro conversione in acetil-CoA (via PEP \rightarrow PIR). Si assume che ciò abbia la funzione di ridurre le C_{ss} degli intermedi del ciclo quando c'è un eccesso di GTP ed ATP. In condizioni di gluconeogenesi (non indicata in questa figura, vedere fig. 7-8), si assume che un incremento della C_{ss}-GTP segnali che il GTP è utilizzato lentamente nella gluconeogenesi, e quindi che non è necessario convertire altri aminoacidi, che sono substrati della gluconeogenesi, in α -cheto-acidi. In condizione di gluconeogenesi, la sintesi di ATP è sostenuta dagli acidi grassi (fig. 7-8).

In questa ipotesi il GTP collegherebbe la velocità della gluconeogenesi con la conversione del glutamato in α -chetoglutarato ed in generale degli aminoacidi nei corrispondenti α -cheto-acidi.

In condizioni di attiva sintesi proteica la C_{ss}-ATP e la C_{ss}-GTP devono essere sufficientemente alte da permettere la formazione dei polipeptidi che costa almeno 4 legami ad alta energia (2 da GDP e 2 da ATP) per ogni legame peptidico che si forma. In questa condizione la C_{ss}-GTP deve essere sufficientemente alta da sostenere la sintesi proteica e da inibire la GDH, ed in questo modo anche il catabolismo a fini energetici degli aminoacidi, per favorire la loro utilizzazione nella sintesi proteica.

L'inibizione del succinil-CoA sull' α -chetoglutarato deidrogenasi (α KG-DH) sembra avere la funzione di rallentare il ciclo di Krebs quando la C_{ss}-GTP aumenta.

La reazione di conversione del succinil-CoA in succinato è all'equilibrio, se la C_{ss}-GTP aumenta, anche la C_{ss}-succinil-CoA aumenta ed inibisce l' α KG-DH. Inoltre, la C_{ss}-succinil-CoA può aumentare indipendentemente dalla C_{ss}-GTP, se per qualche motivo si ha un eccesso di valina, isoleucina, treonina e metionina, aminoacidi, che convergono sul succinil-CoA. In questa ipotetica condizione, l'inibizione della α KG-deidrogenasi ha la funzione di rallentare la reazione per evitare la formazione di un eccesso di succinil-CoA da α KG.

Il GTP appare come l'effettore che coordina il metabolismo energetico (ciclo di Krebs) con l'utilizzazione degli aminoacidi a fini energetici, gluconeogenetici e nella sintesi proteica.

Il mantenimento della C_{ss}-GTP è importante perchè il GTP partecipa a meccanismi di regolazione ormonale e dei fattori di crescita. Ciò è assicurato dalla reazione di risintesi di GTP da ATP e da sintesi autonoma a livello del substrato (reazione succinico sintetasi).

Fig. 7-6

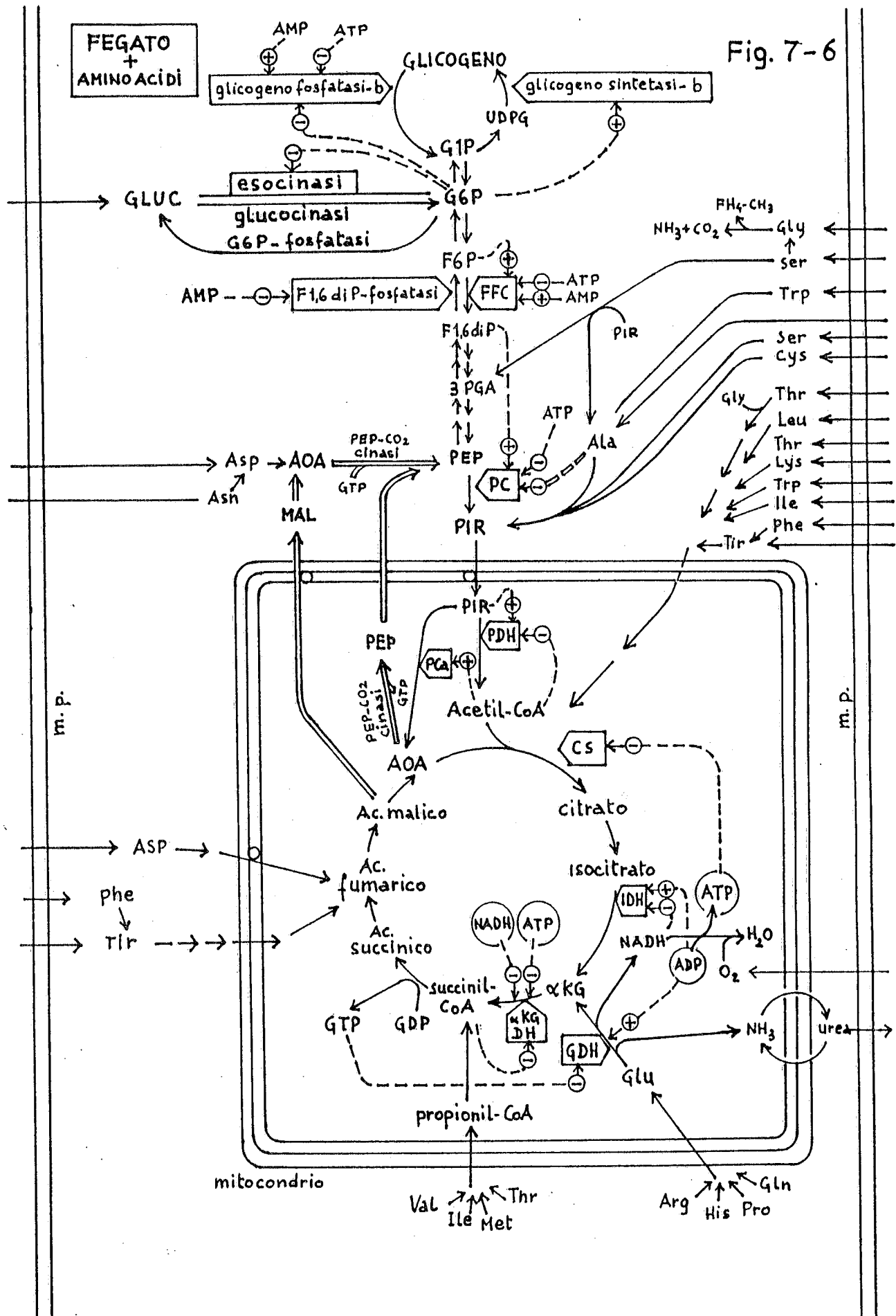


Fig. 7-7

Schema della regolazione da substrato e da effettore del sistema glicolisi-ciclo di Krebs-fosforilazione ossidativa del fegato di mammifero (uomo) alimentato con carboidrati, proteine, lipidi, con eccesso di apporto calorico.

Lo schema rappresenta l'unione delle condizioni metaboliche indicate nelle figure 7-3+7-5 con le rispettive regolazioni (vedere anche figg. 7-1 e 7-2). Per semplicità, i meccanismi di regolazione operati da eccesso di C_{ss}-ATP non sono indicati, e si assume che l'ATP sia prodotto in quantità uguali a quelle richieste dalle sintesi indicate. Si assume che la sintesi di ATP (non è indicata nello schema) avvenga prevalentemente da glucosio al fine di ridurre la glicemia, ed in piccola parte anche dagli aminoacidi.

La disponibilità delle tre componenti alimentari e di ATP, stimola tutte le sintesi de novo e di recupero. Tutte le vie di sintesi emergono dal sistema GII-CIK-PO, senza o con il contributo degli aminoacidi.

Dagli aminoacidi vengono sintetizzate le proteine e composti speciali. Gli aminoacidi partecipano alla sintesi delle basi puriniche e pirimidiniche, alla sintesi dell'eme, e di alcuni P-lipidi.

Dal glucosio vengono sintetizzati il glicogeno, i pentosi e gli acidi grassi, i trigliceridi, il colesterolo, gli acidi biliari. Partecipa alla sintesi dei P-lipidi e dell'eme.

Gli acidi grassi partecipano alla sintesi dei trigliceridi e dei P-lipidi.

Alcuni prodotti finali (o derivati) delle vie di sintesi, possono essere introdotti direttamente con la dieta. Essi includono: colesterolo, eme, basi puriniche e pirimidiniche, nucleosidi.

Questi composti hanno effetti di retroinibizione su enzimi regolati coinvolti nella loro sintesi de novo. Questi effetti hanno la funzione di coordinare l'apporto con la dieta, la sintesi de novo, con le esigenze cellulari del composto, ed evitare accumuli di prodotto oltre i livelli fisiologici.

Due vie (glicogeno sintesi e sintesi degli acidi grassi) sono stimulate da substrato (rispettivamente G6P e citrato). La sintesi del glicogeno ha la precedenza temporale sulla sintesi degli acidi grassi, si assume perchè per attivare la sintesi del glicogeno è sufficiente l'inibizione da ATP della FFC, mentre per la sintesi degli acidi grassi occorre anche un incremento del NADH mitocondriale.

La sintesi di glicogeno è anche più rapida di quella degli acidi grassi perchè richiede meno reazioni. Questa ultima caratteristica è molto importante per la funzione di regolazione della glicemia che è una funzione del fegato. Dopo i pasti c'è un incremento della glicemia, che il fegato tende a ridurre convertendo rapidamente l'eccesso di glucosio in glicogeno. Successivamente, se l'eccesso di glucosio ematico continua, il glicogeno, che può essere accumulato in quantità minore rispetto ai trigliceridi, è degradato fino ad acetil-CoA e convertito in acidi grassi, mentre nuovo glicogeno viene formato da glucosio proveniente

dal sangue. Il glucosio proveniente dal sangue può prendere direttamente (senza passare prima a glicogeno) la glicolisi per essere convertito in acidi grassi. Gli acidi grassi sono esportati principalmente nel tessuto adiposo ed anche nel tessuto muscolare scheletrico e cardiaco, dove sono convertiti in trigliceridi di deposito; una parte di acidi grassi è convertita in trigliceridi nell'epatocita stesso, che li conserva ed in parte li esporta. Tutte le sintesi (incluse quelle che richiedono il contributo degli aminoacidi) dipendono da una opportuna concentrazione di intermedi del sistema GLI-CIK-PO che vengono quindi sottratti a questo sistema. Affinchè ciò avvenga, occorre che la C_{ss}-ATP sia ottimale, cioè sufficientemente alta da permettere all'ATP di contribuire come substrato alla sintesi, ma non eccessivamente alta da inibire glicolisi e c. di Krebs, in modo che queste vie forniscano, in quantità opportuna per le sintesi, intermedi ed ATP. Per alcune sintesi (acidi grassi e colesterolo) si assume che la C_{ss}-NADH mitocondriale sia più alta di quella richiesta per mantenere ottimale C_{ss}-ATP (vedere fig. 7-2).

L'ATP è substrato di tutte le sintesi, come tale o per mezzo di UTP, GTP, CTP, che sono generati dai rispettivi nucleotidi difosfati che reagiscono con ATP. Il GTP è anche prodotto nel ciclo di Krebs, ma la sintesi a cui partecipa (gluconeogenesi e sintesi proteica) necessitano anche di ATP. Quindi l'ATP, oltre a regolare il flusso delle vie cataboliche, regola anche quello delle vie sintetiche perchè le rende energeticamente possibili, e permette la formazione o l'utilizzazione dei loro substrati.

Infatti, se la C_{ss}-ATP diminuisce, tutte le sintesi sono immediatamente rallentate per riduzione dell'apporto energetico dell'ATP e per riduzione dei substrati utilizzati per le sintesi, che vengono degradati nel sistema GLI-CI-PO per riportare la C_{ss}-ATP ai livelli normali.

Il valore calorico delle diete (calorie prodotte dalla combustione degli alimenti in una bomba calorimetrica), pur non tenendo conto della quota di metaboliti derivati dagli alimenti che sono usati come tali per la sintesi (es. aminoacidi per la sintesi delle proteine, glucosio per la sintesi del glicogeno, acidi grassi per la sintesi dei trigliceridi) e quindi non sono ossidati per la sintesi di ATP, è una misura valida per sapere se l'organismo accrescerà o meno il suo peso. Infatti, solo se l'apporto calorico è sufficiente a mantenere in tutte le cellule la C_{ss}-ATP entro valori ottimali per tutta la durata dell'assorbimento da parte dell'intestino degli alimenti digeriti, l'organismo potrà incrementare il suo peso.

La composizione della dieta sembra essere importante solo dopo che si è superato l'apporto calorico minimo. Si sono riscontrate carenze di sintesi proteica in bambini alimentati con sufficienti quantità di proteine ma con un apporto calorico insufficiente. Tutto ciò indica che la richiesta energetica di un organismo (sintesi di ATP) ha la prevalenza su tutte le altre sintesi, indipendentemente dal tipo di alimento ingerito.

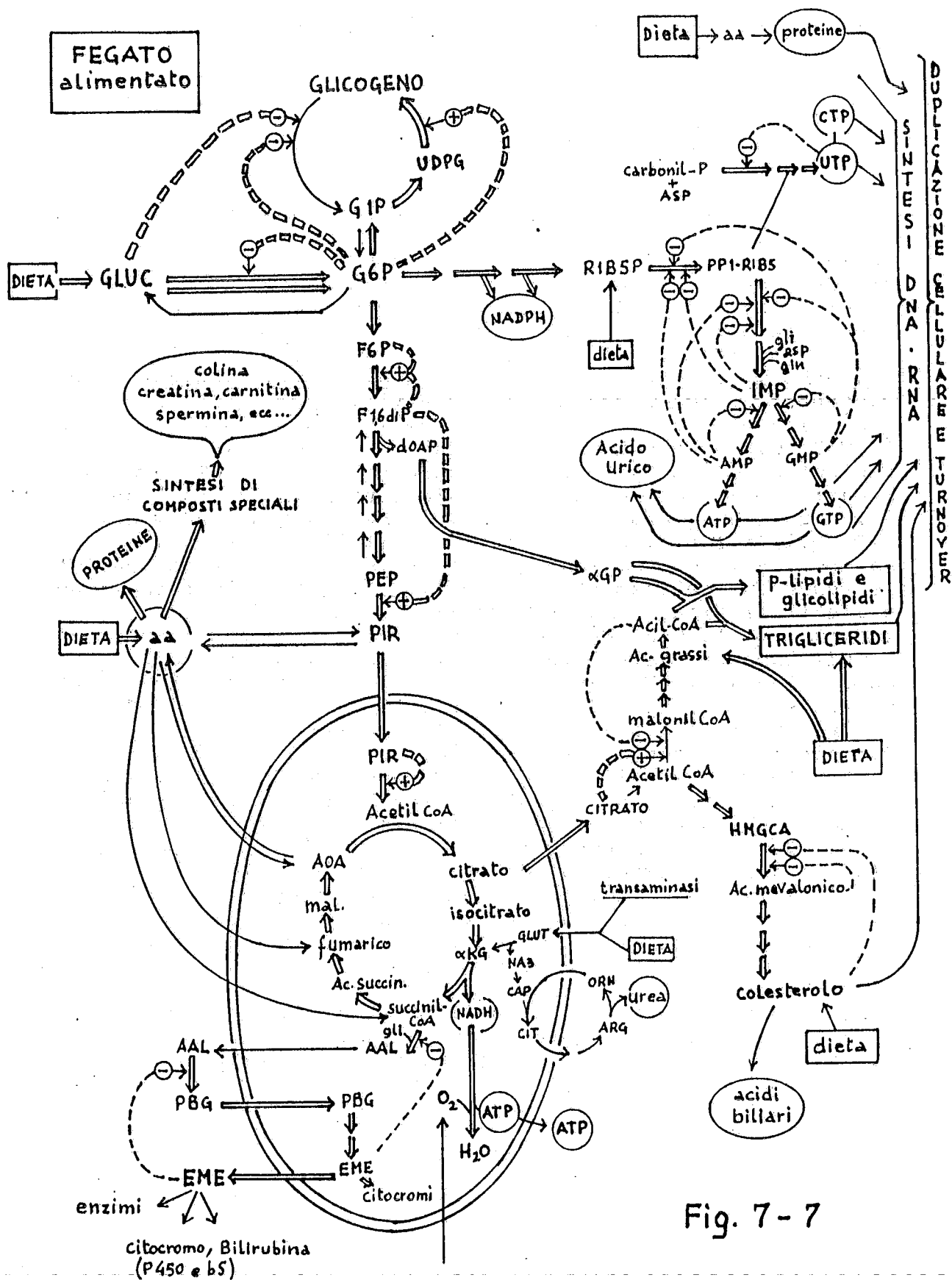


Fig. 7-8

Schema della regolazione da substrato e da effettore del sistema glicolisi-ciclo di Krebs-fosforilazione ossidativa nel fegato di mammifero (uomo) digiuno.

In questa condizione il fegato degrada i suoi composti di riserva (glicogeno e trigliceridi) e le proteine, al fine di sintetizzare glucosio e mantenere la glicemia entro i livelli fisiologici.

Con il digiuno la glicemia tende a scendere, perchè il glucosio ematico è utilizzato in quantità diverse da tutti i tessuti, contemporaneamente il fegato inizia a liberare glucosio nel sangue al fine di sostenere la glicemia. Nelle prime ore di digiuno (4-6 h), il glucosio liberato nel sangue dal fegato, proviene prevalentemente dalla degradazione del glicogeno, successivamente prevale il glucosio sintetizzato da acido lattico, glicerolo, e da aminoacidi provenienti dalla degradazione di proteine epatiche (prime ore) e da proteine muscolari (dopo le prime ore di digiuno); gli altri tessuti contribuiscono con piccole quantità di aminoacidi in relazione alla loro minore massa.

Nel fegato, la sintesi dell'ATP è quasi totalmente a spese degli acidi grassi, liberati dalla degradazione dei trigliceridi epatici e del tessuto adiposo. Contribuiscono alla sintesi di ATP gli aminoacidi chetogenetici.

L'utilizzazione degli acidi grassi determina vari effetti allosterici che favoriscono la gluconeogenesi e la sintesi dei corpi chetonici. L'inizio di una attiva gluconeogenesi e sintesi di corpi chetonici, è associato temporalmente, e si ritiene anche metabolicamente, all'incremento della C_{ss}-acidi grassi nel sangue conseguente la liberazione di acidi grassi nel tessuto adiposo.

La β ossidazione degli acidi grassi, mantiene una C_{ss}-NADH relativamente alta, che alimenta la fosforilazione ossidativa ed inibisce parzialmente la α KG-deidrogenasi (α KG-DH) e la isocitrico deidrogenasi (IDH), e ciò causa un incremento nella C_{ss}-citrato. Il citrato a sua volta inibisce parzialmente la citrato sintetasi (CS), che essendo inibita, mantiene alta la C_{ss}-acetil-CoA. Una volta stabilita una alta C_{ss}-citrato mitocondriale e citoplasmatica, il flusso di citrato nel citoplasma può essere di piccola entità, tuttavia la C_{ss}-citrato è mantenuta alta perchè il citrato è scarsamente metabolizzato a causa della ACC inibita. Da ciò risulta che anche la C_{ss}-acetil-CoA citoplasmatica è alta in condizioni di digiuno. Nel mitocondrio l'acetil-CoA inibisce la piruvato deidrogenasi (PDH), enzima che è inibito anche dal NADH. Il meccanismo di regolazione della PDH è particolare ed è descritto alla fig. 7-9. Si assume che la PDH abbia una attività residua molto bassa e comunque inferiore a quella del CS, e quindi anche a quella degli altri enzimi del ciclo.

L'acetil-CoA ha anche un effetto positivo sulla PCa che catalizza la conversione del piruvato (PIR) in AOA utilizzando ATP. L'azione della PCa, enzima esclusivamente mitocondriale, ha la funzione di convertire in ossalacetato

il piruvato. Il piruvato origina da aminoacidi e dal lattato, si forma nel citoplasma ed entra nei mitocondri dove incontra la PCA attivata e la PDH inibita. La PCA è considerata la prima reazione della gluconeogenesi anche se il piruvato utilizzato, è formato con alcune reazioni da altri metaboliti (aminoacidi, lattato) che sono i reali precursori del glucosio.

L'AOA prodotto nel mitocondrio viene trasformato in PEP mediante la reazione PEPCO_2 -cinasi che utilizza GTP (2° reazione della gluconeogenesi, si assume che sia all'equilibrio allo stato stazionario). Nel mitocondrio, le prime due reazioni della gluconeogenesi (PCA e PEPCO_2C) sono accoppiate ed hanno, nel complesso, un G' fortemente negativo, il loro equilibrio è spostato verso la sintesi di PEP. Quindi la regolazione della PCA, essendo non all'equilibrio, regola le due reazioni. In condizione di digiuno, essendo la PCA attivata da acetil-CoA, si realizza un incremento della sintesi di PEP da piruvato. Anche il GTP prodotto nei mitocondri favorisce come substrato la reazione PEPCO_2C (vedere fig. 7-6). Il PEP fluisce dal mitocondrio nel citoplasma per gradiente di concentrazione.

L'AOA nel mitocondrio è formato anche da tutti gli aa che sono convertibili in intermedi del ciclo di Krebs. La membrana mitocondriale è impermeabile all'AOA, tuttavia l'AOA è esportato dal mitocondrio come aspartato e malato, che nel citoplasma sono riconvertiti in AOA. Il trasporto dal mitocondrio del malato arricchisce il citoplasma oltre che di AOA anche di NADH. Ambedue i composti sono utilizzati per la gluconeogenesi. Nel fegato umano infatti esistono due forme di PEPCO_2 -cinasi, una mitocondriale ed una citoplasmatica.

La PEPCO_2 -cinasi citoplasmatica converte in PEP l'AOA proveniente dal mitocondrio, ed anche l'AOA ottenuto nel citoplasma per transaminazione dell'aspartato proveniente dal sangue.

Il NADH proveniente dai mitocondri (via malato o aspartato) e quello sintetizzato nel citoplasma da acido lattico e αGP , è utilizzato nella gluconeogenesi per far procedere la reazione 3PGal-deidrogenasi in senso inverso a quello della glicolisi, cioè verso la sintesi di glucosio.

Il PEP neosintetizzato è scarsamente riconvertito in piruvato perchè l'enzima piruvato cinasi (PC) subisce l'azione di tre effettori negativi: ATP, alanina ed acetil-CoA. Si assume che, in condizioni di digiuno, le C_{ss} dell'alanina e dell'Acetil-CoA, siano sufficientemente alte da inibire la PC. La C_{ss}-ATP, dato che la gluconeogenesi procede utilizzando 6 legami ad alta energia, può essere non costantemente alta da inibire la PC. L'alanina è un ottimo segnale della disponibilità di aminoacidi nella cellula perchè è un aminoacido molto abbondante nelle proteine, inoltre durante il digiuno molti aminoacidi del tessuto muscolare sono convertiti in alanina. Gli aa del tessuto muscolare cedono $-\text{NH}_2$ al piruvato, via il sistema transaminasi ---> glutamato deidrogenasi ---> glutamato-piruvato-transaminasi e, con meccanismo simile, le cellule intestinali convertono la glutamina, proveniente anch'essa dal tessuto muscolare, in alanina. Gli aa che giungono al fegato sono per il 60% Ala e Gln, e per il 40% altri aa. La

Css-Acetil-CoA aumenta in conseguenza dell'inibizione degli Acil-CoA sulla ACC (fig. 7-5).

Il PEP gluconeogenetico percorre a ritroso le reazioni della glicolisi che sono all'equilibrio, fino a F1,6diP ed è convertito in F6P per azione della fosfatasi specifica (F1,6diP-fosfatasi). Il F6P è scarsamente riconvertito in F1,6diP perchè la FFC è inibita da ATP e citrato.

Il F6P è isomerizzato a G6P ed il G6P è defosforilato a glucosio per azione della fosfatasi specifica (G6P-fosfatasi). In condizioni di digiuno, la bassa glicemia favorisce il flusso di glucosio dalle cellule epatiche al sangue. Si assume che questo flusso favorisca la conversione del G6P in glucosio, e che mantenendo bassa la Css-glucosio nel fegato, riduca l'attività della glucocinasi.

Anche in condizioni di bassa glicemia l'esocinasi è saturata dal glucosio e si assume che sia scarsamente inibita da G6P presente in Css relativamente bassa. Del resto, una Css-G6P relativamente alta, inibirebbe l'esocinasi, ma stimolerebbe anche la sintesi di glicogeno sottraendo così G6P. In realtà in queste condizioni il glicogeno epatico è degradato.

Si assume quindi che il ciclo di substrati Glucosio-G6P sia operante in condizioni di digiuno. Tuttavia, se consideriamo che nella cellula epatica l'esocinasi è scarsa (figg. 7-3 e 7-4) e che in condizioni di ipoglicemia la glucocinasi è poco attiva, se ne deduce che il ciclo di substrati "giri" relativamente poco e che prevalga la defosforilazione del G6P rispetto alla sua sintesi da glucosio. La gluconeogenesi da piruvato avviene utilizzando in senso inverso le reazioni reversibili della glicolisi, mentre le tre reazioni non all'equilibrio in condizioni di glicolisi (esocinasi e glucocinasi, FFC, PC), rimangono tali anche se il flusso di tre di loro è ridotto dai rispettivi inibitori. Queste tre reazioni sono aggirate da altre reazioni, che non sono all'equilibrio, e che tendono a raggiungerlo nel senso della gluconeogenesi (PCa, PEPCO₂C, F1,6diPasi, G6P-asi; la PC è fortemente spostata verso la sintesi dell'AOA e spinge anche la reazione PEPCO₂C che è all'equilibrio). Queste quattro reazioni, dette tipiche della gluconeogenesi, spingono energeticamente la gluconeogenesi e rimangono non all'equilibrio quando la cellula epatica è in condizioni di glicolisi, anche se la loro velocità è molto ridotta.

Le reazioni non all'equilibrio nel senso della glicolisi e quelle a loro accoppiate nel senso della gluconeogenesi, costituiscono dei cicli di substrati. Le reazioni del ciclo, pur essendo catalizzate da enzimi regolati da effettore e da substrato in modo da favorire il flusso in un senso o nell'altro in relazione alle condizioni metaboliche, non impediscono totalmente la riciclaggiatura dei substrati.

L'inibizione da NADH della IDH e della α KGDH ha almeno due funzioni: mantenere una Css-citrato mitocondriale relativamente alta da causare l'inibizione della CS e quindi favorire la formazione dei corpi chetonici; mantenere una Css-citrato citoplasmatica relativamente alta per inibire la glicolisi. Questa inibizione è in relazione allo stato energetico della cellula perchè se la Css-ATP si abbassa, il NADH viene ossidato più rapidamente e la Css-NADH diminuisce riducendo l'effetto inibitorio su IDH e α KGDH, favorendo la riformazione di una Css-NADH relativamente alta. Quindi la

prima parte del ciclo di AOA a succinil-CoA avrà flusso minore rispetto alla seconda parte, da succinil-CoA ad AOA, perchè la seconda parte del ciclo includerà, oltre al flusso metabolico della prima, anche il flusso dei metaboliti originati dagli aminoacidi e che confluiscono su α KG, succinil-CoA, fumarato, malato ed AOA.

L'inibizione del succinil-CoA sulla α KGDH ha la funzione di disciplinare la metabolizzazione dell' α KG e quindi degli aa convergenti su questo metabolita con quello degli aa convergenti sul succinil-CoA, FUM, MAL ed OAA, ed in definitiva con il flusso di esportazione dal mitocondrio di AOA sottoforma di MAL ed ASP, e con il flusso di trasformazione dell'AOA in PEP nel mitocondrio. Per altri aspetti della regolazione della α KGDH, GDH ed IDH vedere le figure 7-1+7-6.

Sommario.

L'attivazione ed il mantenimento della gluconeogenesi da substrato ed effettore, avviene per azione di effettori, le cui C_{ss} aumentano in conseguenza della β ossidazione degli acidi grassi endogeni ed esogeni nel fegato. Questi effettori agiscono attivando una reazione gluconeogenetica (PCa) ed inibendo due reazioni della glicolisi: il pace-maker (FFC) e PC e la reazione di collegamento tra glicolisi e ciclo di Krebs (PDH). Si assume che l'inibizione della glicolisi raggiunga valori vicini al 100%, in modo da permettere l'avvenire della gluconeogenesi solo con l'instaurarsi della β -ossidazione.

Contribuisce all'inibizione della glicolisi l'effetto negativo dell'ALA sulla PC. L'alanina rappresenta il metabolita effettore che mette in relazione la presenza di aa con la gluconeogenesi.

La regolazione da substrati e da effettori della degradazione del glicogeno si assume che avvenga con C_{ss}-G6P relativamente basse, causate da una bassa C_{ss}-glucosio, conseguente la bassa glicemia caratteristica del digiuno.

Fig. 7-8

FEGATO digiuno

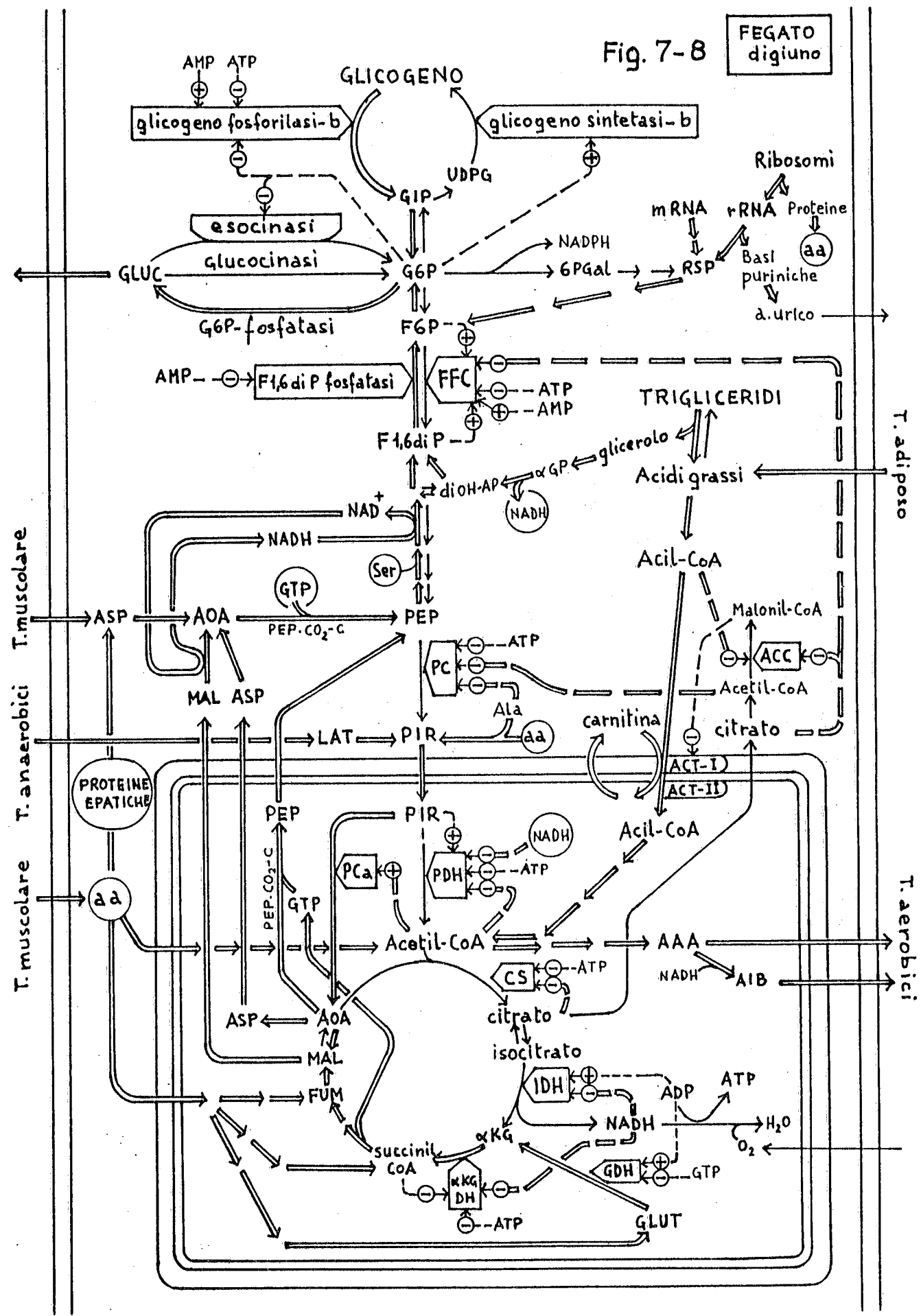


Fig. 7-9.

Meccanismo d'azione degli ormoni che hanno il cAMP come messaggero intracellulare e loro effetto sugli enzimi del metabolismo e sul fattore di iniziazione 2 (eIF_2).

La figura mostra il meccanismo d'azione degli ormoni, la cui associazione al recettore è convertita (trasduzione) in un incremento delle C_{ss}-cAMP all'interno della cellula.

In figura è anche schematizzata l'azione dell'insulina, che con il meccanismo molecolare tuttora non ancora definito (non si conosce il suo messaggero intracellulare) ha una azione di riduzione delle C_{ss}-cAMP e di attivazione degli enzimi proteina-fosfatasi (idrolizzano il fosfato legato covalentemente alle proteine).

Gli ormoni che hanno cAMP come messaggero intracellulare sono almeno 13. In questa figura e nelle seguenti (7-10+7-14) sono presi in considerazione il glucagone (G), insulina (I) e le catecolamine : adrenalina e nor-adrenalina (C), per i loro effetti sul metabolismo energetico, sulle sintesi dei composti di riserva e sulla sintesi delle proteine a livello della traduzione, nel fegato, tessuto muscolare scheletrico e tessuto adiposo. Gli effetti di questi ormoni sul metabolismo del glicogeno sono documentati da moltissime prove sperimentali, e così la regolazione da glucagone sulla FFC; per altri enzimi è provato che sono regolati da enzimi proteina-cinasi cAMP-dipendenti, e se ne è dedotto che siano regolati dagli ormoni suddetti che agiscono facendo aumentare la C_{ss}-cAMP.

Nell'uomo, il glucagone ha come principale organo bersaglio il fegato (non agisce sul tessuto adiposo come invece avviene nel ratto). Il glucagone nel fegato stimola la degradazione del glicogeno e la lipolisi, inibisce la sintesi del glicogeno, degli acidi grassi, dei trigliceridi, del colesterolo e delle proteine. Il glucagone agisce su tutti gli enzimi indicati in figura eccetto la piruvato deidrogenasi (figura c).

Le catecolamine agiscono sul fegato, tessuto muscolare scheletrico, cuore, tessuto adiposo ed altri tessuti non indicati in figura. Esse hanno su questi organi dei recettori specifici detti β_2 -adrenergici. La nor-adrenalina ha gli stessi effetti dell'adrenalina, tuttavia si lega agli stessi recettori con affinità 10 volte inferiore, per cui ha minore capacità di regolazione dell'adrenalina. I recettori β_1 -adrenergici sono localizzati sulle membrane delle fibre muscolari del cuore. Adrenalina e nor-adrenalina hanno la stessa affinità per i recettori β_1 . In questo organo le catecolamine influenzano i parametri della contrazione piuttosto che agire direttamente sul metabolismo.

Le catecolamine hanno, in relazione all'organo bersaglio, alcuni degli effetti indicati in figura.

Questi effetti includono:

1) Stimolazione della glicogenolisi ed inibizione della glicogeno sintesi nel fegato e muscolo scheletrico (vedere a).

2) Inibizione della glicolisi nel fegato per riduzione dell'attivazione di FFC ed inibizione di ePC (tipo L).

Nelle fibre muscolari, la glicolisi è attivata.

L'attivazione delle glicolisi è per substrato (Incremento della C_{ss}-G6P proveniente dal glucosio ematico e dal glicogeno della stessa fibra, vedere punto 1 e per attivazione di FFC (vedere dopo), mentre PC muscolare (tipo M) non è influenzata dalle catecolamine.

3) Stimolazione della lipolisi ed inibizione della sintesi degli acidi grassi e dei trigliceridi nel tessuto adiposo e nel fegato per azione degli enzimi indicati in b. Inibizione della sintesi del colesterolo nel fegato (d). Si assume che nel muscolo scheletrico le catecolamine attivino la degradazione dei trigliceridi ed inibiscano la loro sintesi.

4) Inibizione della sintesi proteica a livello della traduzione per fosforilazione del eIF₂ nel fegato, tessuto muscolare e tessuto adiposo.

Le catecolamine agiscono sul fegato anche legandosi a recettori α_1 -adrenergici che stimolano la glicogenolisi ed inibiscono la glicogenolisi attraverso un meccanismo molecolare di azione che utilizza messaggeri intracellulari diversi dal cAMP (fig. 7-10).

Glucagone e catecolamine incrementano la sintesi del cAMP con un meccanismo molecolare identico (o molto simile), anche se parte delle molecole che lo costituiscono possono essere diverse. Certamente sono diversi i recettori del glucagone e quelli delle catecolamine. Per semplicità in figura si è disegnato un unico recettore indicandolo occupato dal glucagone (G). Vicino è stato posto (C, β_2) per indicare che le catecolamine hanno in senso generale lo stesso meccanismo di attivazione della sintesi del cAMP, ma che utilizzano recettori diversi (i recettori β_2).

L'incremento delle C_{ss}-cAMP per azione del glucagone e catecolamine richiede l'attivazione di un enzima associato alla membrana plasmatica, l'adenilico ciclastasi (AC), che catalizza la reazione da ATP a cAMP con liberazione di pirofosfato. Il pirofosfato è subito idrolizzato in due molecole di fosfato, per cui la reazione di sintesi del cAMP è fortemente spostata verso destra.

La AC è attivata dalla proteina G, un oligomero costituito da 3 subunità (α, β, γ), che a sua volta è attivata dai recettori che hanno associato l'ormone.

La proteina G inattiva, ha associata una molecola di GDP alla subunità α . Quando l'ormone si lega al recettore, questo cambia conformazione e nella nuova conformazione può associare ed attivare la proteina G. L'attivazione operata dal complesso ormone-recettore, consiste nel catalizzare lo scambio di GTP con il GDP associati alla subunità α della proteina G. L'associazione del GTP provoca la dissociazione della subunità α ($G\alpha$) dalle altre due. $G\alpha$ diffondendo, si associa alla AC attivandola.

La subunità α ha attività GTPasica e lentamente idrolizza il GTP a GDP, perdendo in questo modo la sua capacità di attivare l'AC. La subunità α -GDP si dissocia dall'AC e si riassocia alle subunità β e γ per essere riattivata (ciclicamente) dal recettore, sempre che sia ancora attivato dall'ormone. La proteina G ha la funzione di convertire il messaggio ormonale dal recettore alla AC (trasduzione) e quindi il decadere della sua azione assolve all'importante funzione di far dipendere l'attività della AC alla presenza

dell'ormone sul recettore.

Le proteine G sono una famiglia di proteine molto simili tra loro, tutte formate da tre subunità (α, β, γ) che differiscono molto probabilmente solo per la subunità α . Le subunità α avrebbero una microeterogeneità di sequenza che risulta in differenze nell'attività biologica della proteina G. In figura a è indicata la proteina G, detta anche Gs (s=stimola) che stimola la proteina cinasi. La proteina G è attivata dai recettori del glucagone e da quelli β_2 -adrenergici. La proteina G che risponde ai due ormoni può essere anche una unica specie molecolare, oppure due molecole diverse per una subunità, rispettivamente specifiche per i recettori del glucagone e delle catecolamine.

Nelle cellule esiste anche una proteina Gi (i=inibisce) formata dalle subunità α, β, γ , ma la subunità α è modificata e la sua azione provoca l'inibizione dell'adenilato ciclasi e la riduzione della Csa-cAMP. L'attivazione della proteina Gi è operata da ormoni (o altre molecole effettore), diversi da quelli che stimolano Gs nella stessa cellula, oppure è operato dallo stesso tipo di ormone che stimola Gs ma che si lega ad un recettore diverso.

Quest'ultimo caso si verifica con l'adrenalina, che associata al recettore α_2 inibisce l'adenilato ciclasi (via Gi), mentre associata al recettore β_2 attiva l'adenilato ciclasi (via Gs).

Il complesso adrenalina-recettore α_2 provoca (mediante lo scambio del GDP con GTP) l'attivazione della proteina Gi, la subunità α si dissocia ed il dimero $\beta-\gamma$ si lega alla subunità α della proteina Gs dissociandola dalla adenilato ciclasi e causando l'inattivazione dell'enzima. Il meccanismo è efficiente perchè nella cellula con recettori α_2 ci sono più molecole Gi che Gs. Quindi la sensibilità diversa allo stesso ormone, risulta dal differenziamento delle cellule, che pur avendo i due tipi di recettore hanno quantità relative diverse di Gi e Gs.

Altre proteine G, tutte attivate con lo stesso meccanismo di scambio GTP-GDP operato da recettori posti nella membrana plasmatica, hanno effetti diversi agendo su enzimi diversi dalla proteina cinasi, o su proteine non enzimatiche.

La famiglia delle proteine G è un altro esempio di come la natura, operando piccoli cambiamenti sulle molecole (in questo caso sulle subunità α) e mantenendo lo stesso meccanismo d'azione, riesca a diversificare e quindi a realizzare più azioni biologiche.

Il cAMP attiva un enzima oligomero, proteina cinasi, che nel muscolo è formato da due subunità uguali "catalitiche" (C) e due subunità uguali "di regolazione" (R). Si assume che le proteine cinasi del fegato e del T. adiposo siano simili come struttura molecolare e che siano regolate in maniera identica a quella del muscolo. In assenza di cAMP la proteina cinasi è inattiva perchè le subunità R inibiscono le subunità C.

Quando il cAMP si associa alla subunità R induce in essa un cambiamento di conformazione che provoca la dissociazione delle due subunità C, mentre le subunità R rimangono unite. Le due subunità C divenute libere, cambiano conformazione e divengono cataliticamente attive.

Le proteina-cinasi attivate da cAMP sono dette proteina cinasi A e sono una famiglia di enzimi simili che, utilizzando ATP, catalizzano la reazione di fosforilazione di residui di serina di varie specie molecolari di proteina. Una stessa proteina cinasi A può fosforilare enzimi diversi e provocare su essi effetti diversi: attivare uno ed inibire l'altro. Un esempio è la fosforilazione degli enzimi glicogeno fosforilasi (attivato) e la glicogeno sintetasi (inibito).

In figura, per semplicità, è indicata una sola proteina cinasi per ogni tipo di enzima.

Il meccanismo d'azione dell'ormone, a valle della proteina cinasi C, non è identico per la regolazione di tutti gli enzimi bersaglio (quelli che catalizzano le reazioni del metabolismo) e proteine bersaglio (fattori di specificità come l'eIF2 o con altre attività biologiche), cioè gli oggetti della regolazione ormonale.

I meccanismi osservati sono almeno 5:

1) La proteina cinasi-A fosforila direttamente l'enzima bersaglio inibendolo. Esempi: glicogeno sintetasi, piruvato cinasi, α GP-acil-CoA transferasi, o attivandolo, esempio: lipasi (a,b di questa figura).

2) La proteina cinasi-A fosforila una proteina cinasi (attivandola), che a sua volta fosforila specificamente un solo enzima od una sola proteina bersaglio. Esempi: glicogeno-fosforilasi-cinasi (attivato), eIF2-cinasi (inibito) (a,d di questa figura). Si ritiene che l'inserimento di un altro enzima proteina cinasi specifico per l'enzima o per la proteina bersaglio abbia almeno due funzioni: -amplificare ulteriormente il segnale ormonale e quindi attivare (od inibire) nell'unità di tempo un numero maggiore di molecole di glicogeno-fosforilasi-b e di eIF₂ (rispetto agli altri enzimi attivati od inibiti direttamente dalla proteina cinasi-A); -di permettere l'azione solo sull'enzima o sulla proteina bersaglio di specifici effettori non-ormonali, cioè ioni o metaboliti cellulari (es.: Ca^{2+} , fig.7-21; glucosio, fig.7-12; eme, fig.7-18, vedere anche dopo i punti 1 e 2 delle caratteristiche del meccanismo a "cascata").

3) La proteina cinasi-A fosforila un enzima (attivandolo) che catalizza la sintesi di una piccola molecola (F2,6diP) che è effettore allosterico di enzimi coinvolti nel metabolismo (es. fosfofruttocinasi e fruttosio 1,6-P fosfatasi). Il F2,6diP non è un metabolita-effettore perchè ha solo funzioni di regolazione. Il fatto di non essere metabolita è importante perchè rende il F2,6diP indipendente dalle fluttuazioni della velocità delle vie metaboliche (come avviene per i metaboliti F1,6diP ed AMP attivatori di FFC). In questo modo, l'ormone può imporsi sulla regolazione da effettore perchè il F2,6diP è capace (anche agendo sinergicamente con l'AMP) di rimuovere l'inibizione operata da ATP e citrato. Quindi l'azione del F2,6diP è dipendente solo dall'azione dell'ormone essendo indipendente dallo stato metabolico della cellula. Il F2,6diP è sintetizzato e degradato in due reazioni distinte, F6P-cinasi e F2,6diP fosfatasi, ambedue catalizzate da un unico enzima (detto tandem, impropriamente, perchè con il tandem meccanico i propulsori, uomo, cavallo o motore, procedono nella stessa

direzione).

Nel fegato, la forma fosforilata dell'enzima tandem, prodotta dall'azione del glucagone e delle catecolamine, è attiva come fosfatasi ed inattiva come cinasi, per cui causa un decremento della $Css-F2,6diP$ che risulta nella attivazione (per riduzione dell'inibizione) di $F1,6diP$ -fosfatasi e contemporaneamente all'inibizione per riduzione dell'attivazione) di FFC. La forma defosforilata dell'enzima tandem (la cui formazione è stimolata dall'azione dell'insulina) è inattiva come fosfatasi ed attiva come cinasi. Ciò causa un incremento della $Css-F2,6diP$ che risulta simultaneamente nell'attivazione di FFC ed inibizione di $F6P$ -fosfatasi. L'effetto opposto della fosforilazione e defosforilazione sulle due attività dell'enzima tandem evita la formazione di un ciclo futile tra $F6P$ e $F2,6diP$. L'effetto opposto del $F2,6diP$ su FFC e $F6P$ -fosfatasi evita la formazione del ciclo futile tra $F6P$ e $F1,6diP$.

Nel muscolo, la FFC è attivata da $F2,6diP$ come avviene nel fegato, tuttavia nelle fibre muscolari scheletriche la forma fosforilata dell'enzima tandem è attiva come $F6P$ -cinasi ed inattiva come $F1,6diP$ (il contrario di ciò che risulta nel fegato). Risulta così che nel muscolo le catecolamine determinano un incremento della $Css-F2,6diP$ e quindi attivano la FFC, mentre nel fegato determinano un decremento della $Css-F2,6diP$ e quindi la FFC non risulta attivata, in accordo con le diverse funzioni dei due organi (vedere dopo).

4) La proteina cinasi-A fosforila una proteina attivandola come inibitore di una proteina fosfatasi. L'azione dell'inibitore sulla fosfatasi provoca l'accumularsi della forma fosforilata dell'enzima bersaglio. Un esempio è l'inibitore-1 che agisce sulla proteina fosfatasi-1. Risulta così che la defosforilazione degli enzimi bersaglio è dipendente dal cAMP, mentre la fosforilazione può essere dipendente dal cAMP (come per glicogeno-fosforilasi-cinasi, glicogeno-fosforilasi e glicogeno sintetasi, (a)) oppure indipendente dal cAMP (HMG-CoA reduttasi) ((d) e fig. 7-14).

5) La proteina cinasi-A fosforila l'enzima coinvolto nel metabolismo dopo che l'enzima è già stato fosforilato (su altri residui di serina o treonina) da una proteina cinasi non cAMP-dipendente (es. acetil-CoA carbossilasi) (b).

L'azione ormonale è considerata gerarchicamente più importante della regolazione da effettori. Le prove molecolari di questa gerarchia sono le seguenti:

- 1) Alcuni enzimi, nella forma attivata dall'ormone sono insensibili all'azione degli effettori (glicogeno-fosforilasi-a, glicogeno-sintetasi-a).
- 2) L'azione ormonale può imporsi su quella da effettore (F2,6diP attiva e rimuove le inibizioni da ATP e citrato su FFC).
3. Almeno una forma enzimatica attivata dall'ormone è sensibile agli effettori (PC)
4. Si conosce un caso in cui l'effettore si impone all'azione dell'ormone limitatamente ad un singolo enzima (inibizione da glucosio di glicogeno-fosforilasi-a, questa figura (e)) e fig.11c.
5. In altri casi (figg. 7-12 e 7-13), il quadro metabolico instaurato dall'ormone richiede la regolazione da effettore su uno o più enzimi.
6. Le Css dei metaboliti effettori che intervengono in accordo o in opposizione alla regolazione ormonale sono opportunamente modulate dall'azione dell'ormone stesso che agisce su altri enzimi della cellula o di cellule diverse. Nel caso del glucosio, la Css-glucosio nelle fibre muscolari può essere incrementata dall'azione dell'ormone (catecolamine) che agisce sul fegato provocando la glicogenolisi e quindi iperglicemia (fig.11c). Quindi i dati sulla regolazione degli enzimi operata dagli ormoni conferma che la regolazione ormonale sia gerarchicamente più importante di quella da effettore perché l'ormone instaura un quadro metabolico specifico, sia agendo direttamente su gli enzimi (attivandoli od inibendoli, rendendoli sensibili o insensibili agli effettori) o facendo variare opportunamente le Css di metaboliti e metaboliti effettori della cellula.

Il meccanismo d'azione ormonale, operando mediante vari passaggi (indicati come "cascata"), presenta alcune caratteristiche importanti:

- 1) L'amplificazione del segnale. Con una concentrazione ematica di ormone molto bassa (circa 10^{-6} a 10^{-12} M), e con un numero di recettori cellulari relativamente piccolo (circa 10^4 /cellula), l'ormone ed il recettore associandosi catalizzano la formazione di molte molecole Gα-GTP, che attivano un egual numero molecole di adenilico ciclasi (AC) già presenti nella cellula. Le molecole di AC attivate formano molte molecole di cAMP che attivano circa altrettante molecole di proteina cinasi-A. Le molecole di proteina cinasi-A attivano molte proteine bersaglio. Ogni passaggio, che include l'attività di catalisi, porta ad una amplificazione del segnale. L'amplificazione del segnale permette che ci siano molecole di proteina cinasi-A attiva in quantità sufficiente ad interagire con tutte le proteine (enzimi ed inibitori) suoi substrati. Con l'amplificazione del segnale è insito anche un incremento della velocità dell'azione ormonale. Senza amplificazione del segnale potrebbe essere attivata (o inibita) una sola molecola dell'enzima bersaglio per ogni complesso ormone-recettore (cioè mediante una unica reazione) ed occorrerebbero tempi

molto più lunghi per rendere attive molte molecole di enzima bersaglio. Quindi, l'amplificazione del segnale ha la funzione principale di rendere veloce il meccanismo d'azione dell'ormone, causando nel sistema di reazioni (detto "a cascata") la formazione di un numero progressivamente maggiore di molecole attive mano a mano che si allontana dal recettore. Quindi l'effetto "a cascata", creando una progressiva amplificazione del segnale, determina una accelerazione della formazione del prodotto finale rispetto alla velocità della trasduzione del segnale ormonale. Non tutti i passaggi amplificano il segnale precedente. Ad esempio, tra cAMP e subunità catalitica della proteina cinasi, il rapporto è 1 ad 1.

Glicogeno fosforilasi-b ed eIF2 sono fosforilati da proteina-cinasi specifiche. Si assume che la funzione di una reazione enzimatica in più nella "cascata" di reazioni sia quella di accelerare ulteriormente il segnale ormonale in modo che arrivi più rapidamente all'attivazione (o alla inibizione) di uno specifico enzima o di una specifica proteina bersaglio. Al fine che l'effetto amplificazione-velocità interessi un unico enzima (o proteina) bersaglio, la proteina cinasi "in più" è specifica per un solo substrato-proteina. Questo incremento dell'effetto amplificazione-velocità su glicogeno fosforilasi-b-cinasi appare in relazione alla funzione di riserva del glicogeno epatico e di quello muscolare, che devono essere rapidamente degradati specialmente nelle condizioni di stress aggressivo, quando vengono secrete le catecolamine. Secondo l'ipotesi sopra indicata, l'inibizione della glicogeno sintetasi, diretto substrato della proteina cinasi-A, risulta inibita più lentamente di quanto sia attivata la glicogeno fosforilasi-b-cinasi. Si assume che in genere, nelle condizioni in cui sono secrete le catecolamine, la glicogeno sintetasi rallenti comunque la sua azione perchè il G6P viene più rapidamente metabolizzato nella glicolisi (muscolo) o nella reazione G6P-fosfatasi (fegato) e perchè l'ATP necessario per la sintesi del glicogeno è utilizzato per la contrazione muscolare o per la gluconeogenesi epatica vie specificamente attivate.

L'amplificazione del segnale per l'inibizione del eIF2 appare legata al numero di molecole di eIF2/cellula che si assume alto, perchè alto è il numero delle specie molecolari di mRNA presenti nella cellula (circa 10^5). Non essendo mRNA-specifico, l'eIF2 deve essere presente in concentrazione sufficiente alta da poter interagire con più molecole delle varie specie molecolari di mRNA presenti nella cellula. In particolare, quando si ha una attivazione simultanea della sintesi di un gran numero di specie molecolari di proteina, ad es. per azione dell'insulina, molte molecole di eIF2 devono essere attivate simultaneamente. Quindi, con il verificarsi rapido di una situazione opposta, ad esempio secrezione di catecolamine, per avere una pronta inibizione della sintesi proteica occorre una maggiore amplificazione e quindi velocità del segnale ormonale, e si assume che ciò sia conferito da eIF2-cinasi. La presenza di una reazione cinasica in più appare giustificata dal fatto che la sintesi proteica richiede molta energia (almeno 4 legami ad alta energia per

legame peptidico) e ciò è in contrasto con lo stato di preparazione o di sostentamento all'attacco od alla fuga operato dalle catecolamine.

La presenza di un enzima-cinasi in più oltre all'effetto di amplificazione del segnale, conferisce con la specificità di substrato, l'azione mirata su un unico enzima bersaglio ed inoltre l'integrazione del sistema ormonale con altri meccanismi di regolazione (vedere punto 2). La perfezione del meccanismo rende difficile capire quale dei tre effetti (amplificazione, specificità di bersaglio, integrazione con la regolazione da effettore) sia più importante.

2) Modulazione dell'azione ormonale per azione di altri ormoni od effettori di regolazione che agiscono su molecole che sono parte del meccanismo d'azione del primo ormone, oppure a comune tra i due ormoni.

Esempi: l'antagonismo tra proteine G diverse, l'antagonismo tra ormoni (glucagone ed insulina) sull'attività della proteina fosfatasi-1, e sulla Csa-cAMP. L'azione del Ca^{2+} (liberato con la contrazione muscolare) sulla glicogeno fosforilasi-b-cinasi già attivata o non ancora attivata dall'adrenalina (fig. 7-22), l'azione diretta dell'eme su eIF2 (fig. 7-19), l'azione del glucosio sulla glicogeno fosforilasi-b-cinasi ((e), fig. 7-12, 7-22).

Al fine che l'azione dell'effettore sia specifica sull'enzima o proteina bersaglio, occorre che la proteina cinasi sensibile agli effettori sia anch'essa specifica per l'enzima o proteina bersaglio. Quindi l'intervento di effettori non-ormonali (metaboliti od ioni) sugli enzimi facenti parte del meccanismo di regolazione operato dagli ormoni, richiede la presenza di un enzima in più e specifico per le molecole proteiche bersaglio. L'aggiunta di un enzima, cioè di una reazione catalizzata, incrementa l'amplificazione e quindi la velocità del meccanismo d'azione ormonale, inoltre dà la possibilità di renderlo sensibile all'azione di effettori non dipendenti dall'azione ormonale. La natura appare molto opportunistica, sfrutta al massimo le molecole per avere il massimo dei vantaggi. Con un solo enzima (un solo gene) ottiene una maggiore velocità d'azione ormonale specifica sulla proteina bersaglio con la possibilità di essere regolata da effettori anche non ormonali.

3) La costituzione di famiglie di molecole proteiche che fanno parte del meccanismo molecolare d'azione dell'ormone al fine di diversificare l'azione biologica utilizzando lo stesso meccanismo molecolare (esempio: proteina G).

4) L'azione dell'ormone ha effetti opposti sulle vie di sintesi e di degradazione di uno stesso composto.

Prendendo ad esempio il metabolismo del glicogeno, si osserva che il meccanismo molecolare attivato dall'ormone (glucagone o catecolamine), causa la fosforilazione e quindi l'attivazione della glicogeno fosforilasi e l'inibizione della glicogeno sintetasi. La logica è di evitare che si formi un inutile ciclo, cioè che il glicogeno, che è degradato a G1P, venga risintetizzato con solo spreco di energia (ATP) (ciclo di substrati, figg. 5-7 e 7-23). Lo stesso meccanismo attiva, mediante fosforilazione, un inibitore di natura proteica detto Inibitore-1, che agisce sulla proteina fosfatasi-1, enzima che riconverte le forme

fosforilate degli enzimi del metabolismo del glicogeno (fosforilasi a e sintetasi b) nelle forme defosforilate. In questo modo (attivazione dell'inibitore-1) è inibita l'azione della fosfatasi-1 (che si oppone all'azione dell'ormone) simultaneamente sui due enzimi, rispettivamente sintetico e catabolico del glicogeno. In questo modo è evitato un altro ciclo di substrati, cioè che le molecole di enzima fosforilato (glicogeno fosforilasi-a e glicogeno sintetasi-b) vengano defosforilate nuovamente con spreco di energia (ATP).

Quando la C_{ss}-glucagone e/o C_{ss}-adrenalina decrescono e la C_{ss}-insulina aumenta, il meccanismo di azione via la sintesi di cAMP e l'attivazione della proteina cinasi-A riduce la sua attività, mentre la proteina fosfatasi-1 viene attivata con un meccanismo doppio, attivazione diretta, e per inattivazione dell'inibitore-1.

Anche in questo modo si ha simultaneamente ed opportunamente l'attivazione della glicogeno sintetasi e l'inibizione della glicogeno fosforilasi.

Fosforilazione e defosforilazione avvengono, anche se in quantità minime, sempre anche quando i rispettivi enzimi sono inibiti. Sebbene ciò costi energia, essa è solo apparentemente sprecata, perchè permette l'esistenza di un sistema di attivazione capace di rapide risposte e facilmente reversibile (figg. 5-7 e 7-24).

5) L'ormone e tutti gli effetti prodotti dall'ormone decadono nel tempo.

L'ormone rilasciato nel sangue ha vita breve perchè è continuamente inattivato dal fegato o da altri organi, o il complesso ormone-recettore può essere trasferito all'interno della cellula per endocitosi e l'ormone degradato nella cellula stessa (vedere dopo (f)).

La vita degli ormoni appare in relazione inversa alla velocità del loro meccanismo d'azione. Se l'ormone agisce attivando proteine già presenti nella cellula (come mostrato in questa figura), data la rapidità del meccanismo, è sufficiente che l'ormone agisca per un breve tempo (anche per avere una pronta reversibilità d'azione). Ormoni con questo tipo di meccanismo d'azione hanno tempi di $\frac{1}{2}$ vita tra 2 e 15 min. Gli ormoni che agiscono promuovendo specificamente la sintesi di una o più proteine con un meccanismo d'azione che inizia attivando la trascrizione dei relativi geni, deve poter "esistere" un tempo sufficientemente lungo da rendere possibile la sintesi di un definito numero di molecole di proteina, date le molte reazioni che tale sintesi richiede.

Gli ormoni steroidei che attivano specificamente l'espressione di geni, hanno vita più lunga (circa 1 h di tempo $\frac{1}{2}$ vita) degli ormoni che agiscono su proteine già presenti nella cellula.

Gli ormoni del primo tipo possono avere anche la proprietà di stimolare la sintesi di proteine, e per osservare sperimentalmente questa loro azione, la loro C_{ss} nel sangue deve rimanere alta (per persistenza dello stimolo alla secrezione dell'ormone) per tempi più lunghi di quelli necessari per osservare l'azione dello stesso ormone sull'attività di proteine già presenti nelle cellule bersaglio. Oppure il loro recettore può avere un meccanismo

per il mantenimento della stimolazione ormonale (vedere dopo insulina).

Si assume che la velocità di inattivazione dell'ormone sia regolata da substrato in relazione alla C_{ss}-ormone. Si assume che la C_{ss}-ormone nel sangue sia principalmente regolata dalla velocità della sintesi dell'ormone e che la C_{ss}-ormone aumenti e poi rimanga costante se persiste lo stimolo che causa la sua secrezione.

La proteina G si inattiva spontaneamente idrolizzando il GTP. L'inattivazione della proteina G_s può essere accelerata per azione della proteina G_i.

Il cAMP è continuamente idrolizzato ad AMP per azione dell'enzima fosfodiesterasi. Il decremento della C_{ss}-cAMP può essere accelerato dall'azione di ormoni. Uno dei meccanismi di azione proposto per l'insulina è l'attivazione della fosfodiesterasi.

La caffeina inibisce la fosfodiesterasi e causa un incremento delle C_{ss}-cAMP, mimando così una attivazione della adenilico ciclasi. L'innalzamento della C_{ss}-cAMP per inibizione da caffeina della fosfodiesterasi (cioè non per attivazione della adenilico ciclasi) indica che la sintesi di cAMP avviene continuamente, anche con i livelli basali delle C_{ss}-catecolamine, cioè in assenza di particolari stimoli alla secrezione di questi ormoni. L'azione della caffeina sulla fosfodiesterasi spiega l'aspetto delle "droghe" che mima l'azione di normali effettori di regolazione.

L'abbassamento della C_{ss}-cAMP per legge d'azione di massa fa dissociare i complessi cAMP-subunità-R dell'enzima proteina cinasi A. Le subunità R cambiano conformazione e per legge di azione di massa si riassociano le subunità C.

Riassumendo la forma tetrameric, la proteina cinasi A diviene inattiva.

Tutte le proteine fosforilate direttamente o indirettamente dalle proteine cinasi A, sono continuamente defosforilate. La proteina fosfatasi-1 è attivata da insulina che accelera la conversione della glicogeno fosforilasi-a nella sua forma inattiva, agendo sia sull'enzima che sull'inibitore-1 (vedere (a)).

Il glucosio inibisce la glicogeno-fosforilasi-a con due meccanismi (vedere (e)) : si associa all'enzima e lo induce ad assumere la conformazione inattiva (simile a quella dell'enzima defosforilato; inoltre in questa conformazione l'enzima è più affine alla proteina fosfatasi-1 e viene più velocemente defosforilato e quindi reso inattivo. Poiché il glucosio agisce sul substrato (glicogeno fosforilasi-a) e non sull'enzima (proteina fosfatasi-1) la sua azione di attivazione della defosforilazione è specifica sulla glicogeno sintetasi-a, cioè non interessa la defosforilazione di altri enzimi substrati della stessa proteina fosfatasi-1.

Il meccanismo molecolare d'azione degli ormoni è costruito in modo che la loro azione possa instaurarsi velocemente ed essere velocemente annullata e, se necessario, più rapidamente rovesciata dall'azione di ormoni antagonisti. Gli ormoni antagonisti agiscono sugli stessi enzimi e proteine bersaglio dell'altro ormone, ma hanno su essi effetti di regolazione opposti.

Se non c'è l'azione dell'ormone antagonista, l'azione

dell'ormone decade più lentamente e la regolazione del metabolismo cellulare viene riassunta progressivamente dai metaboliti effettori intracellulari. Da ciò ne consegue che per avere una azione ormonale continua, occorre che permanga nel tempo lo stimolo alla secrezione dell'ormone.

Il complesso ormone-recettore può essere anche temporaneamente inattivato, tuttavia questo effetto non ha la funzione di rimuovere l'azione dell'ormone, ma di adattare (o desensibilizzare) il sistema di trasduzione del segnale ad una concentrazione di ormone che rimane costante nel sangue. Questo effetto è stato studiato nei recettori β_2 adrenergici che, esposti a concentrazioni costanti di adrenalina, dopo un certo periodo di tempo non attivano più la proteina Gs. Ciò è causato da una proteina cinasi specifica per il complesso ormone-recettore che fosforila su più residui di serina la parte citoplasmatica del recettore, rendendo il complesso inattivo o meno attivo. Il recettore che non ha associato l'ormone non è substrato della proteina cinasi. Il recettore è riattivato per defosforilazione, catalizzata da una specifica proteina fosfatasi. L'adattamento al segnale costante è molto utile perchè permette al sistema di trasduzione del segnale (ormone-recettore-proteina-G) di rispondere a cambiamenti di concentrazione piuttosto che a valori assoluti di concentrazione di ormone, e quindi operare rispondendo a variazione di concentrazione di ormone di una vasta gamma di concentrazione di base.

Il meccanismo si può spiegare nel modo seguente: supponiamo che la Css-adrenalina nel sangue aumenti ad un dato valore, per azione di massa si formerà un certo numero di complessi ormone-recettore che attiveranno il sistema fino alle proteine bersaglio. Se la Css-adrenalina nel sangue rimane costante (la velocità di secrezione dell'ormone è uguale alla velocità della sua inattivazione), non ci può essere la rimozione dell'azione ormonale per la persistenza dello stimolo. In questa condizione, i complessi adrenalina-recettore che rimangono tali per un tempo sufficientemente lungo da permettere l'associazione della proteina cinasi specifica per il recettore, vengono fosforilati ed inattivati. Ciò causa una progressiva riduzione dell'azione dell'adrenalina all'interno delle cellule, pur rimanendo costante la concentrazione dell'ormone nel sangue perchè permanga lo stimolo che provoca la secrezione di adrenalina.

Tuttavia, se la Css-adrenalina aumenta di nuovo, l'adrenalina si assocerà a recettori ancora liberi attivandoli, e la trasduzione del messaggio ed i passaggi successivi potranno avvenire normalmente. Se la Css-adrenalina nel sangue si stabilizza al nuovo livello, dopo un certo tempo si avrà un nuovo adattamento alla nuova Css-adrenalina. Se poi la Css-adrenalina nel sangue si abbassa, il complesso adrenalina-recettore si dissocia ed il recettore, non più substrato della proteina cinasi, ha tempo di essere defosforilato e quindi di adattarsi a Css-adrenalina più basse.

Azione dell'insulina. L'insulina è secreta quando l'organismo riceve apporto calorico (si alimenta) sotto forma di carboidrati. Essa stimola in tutte le cellule, tutte le sintesi direttamente (attivando enzimi delle vie di sintesi) ed indirettamente incrementando le C_{ss} dei primi substrati delle vie metaboliche. L'insulina non stimola la gluconeogenesi e la sintesi dei corpi chetonici, perchè sono sintesi che avvengono nel fegato in condizioni di digiuno, cioè in condizioni in cui non è secreta insulina. La gluconeogenesi avviene anche nel riposo dopo esercizi muscolari intensi e durante e dopo esercizi muscolari prolungati.

Le cellule rispondono all'insulina in relazione al loro patrimonio enzimatico, cioè in relazione al loro stato di differenziamento. Qui verranno schematizzate le azioni dell'insulina sul fegato, tessuto adiposo e tessuto muscolare. L'insulina stimola la sintesi del glicogeno (fegato e T. muscolare), trigliceridi, e la sintesi delle proteine a livello della traduzione (fegato, T. muscolare, T. adiposo), stimola la permeabilità del glucosio e degli aminoacidi nel tessuto muscolare e tessuto adiposo e degli aminoacidi nel fegato. Il meccanismo molecolare d'azione dell'insulina non è stato ancora completamente definito (non si conosce il 2° messaggero). L'insulina causa una riduzione della cAMP ed una attivazione degli enzimi proteina fosfatasi. Non si conosce se l'insulina riduca la C_{ss}-cAMP per attivazione della fosfodiesterasi o con altro meccanismo, nè se l'effetto dell'ormone sia ristretto solo alla proteina fosfatasi-1 ed alla piruvato deidrogenasi-fosfatasi.

Tuttavia si ipotizza che l'insulina antagonizzi l'azione del glucagone e delle catecolamine, attivando tutte le proteine fosfatasi che fanno parte dei meccanismi molecolari d'azione degli ormoni (a,b,c,d,e), ed anche la PDH-fosfatasi (c) che agisce su un enzima che è fosforilato da una proteina-cinasi sensibile agli effettori e non ad ormoni (c).

Alcuni aspetti molecolari del recettore dell'insulina sono stati chiariti. Essa appartiene ad una classe di recettori diversa da quella del glucagone e catecolamine (vedere questa figura (f)). Il recettore attraversa tutta la membrana plasmatica, nella parte extracellulare associa specificamente l'insulina, e nella parte citoplasmatica è una proteina cinasi con due siti di catalisi, che catalizza (specificamente) la fosforilazione di proteine su residui di tirosina. La natura molecolare dei substrati della tirosina cinasi del recettore dell'insulina è discussa, per cui non si conosce nel dettaglio la funzione della tirosina cinasi. La tirosina cinasi è attivata dall'associazione dell'insulina al recettore, e l'enzima si autofosforila su quattro residui di tirosina. L'autofosforilazione incrementa l'attività tirosina cinasica del recettore e lo stabilizza, per cui l'enzima rimane attivo anche quando l'insulina si dissocia dal recettore. L'attività della tirosina cinasi insulina-dipendente, è ridotta dall'azione degli enzimi proteina-cinasi-A (cAMP-dipendente) e proteina-cinasi-C (DAG- e IP₃-dipendente (fig. 7-10). Queste proteina-cinasi sono attivate da ormoni (glucagone e catecolamine) la cui azione si oppone all'azione dell'insulina.

e) Meccanismo molecolare di regolazione dell'enzima glicogeno-fosforilasi. (Barford e Johnson, Nature 340, 609-616, 1989).

L'enzima può esistere in due conformazioni: cataliticamente attiva (quadrati) e cataliticamente inattiva (cerchi). Le due conformazioni sono in equilibrio fra loro e l'equilibrio può essere spostato mediante due meccanismi:

- 1) per azione di reazioni covalenti: la fosforilazione stabilizza la conformazione attiva, la defosforilazione permette la riassunzione della forma inattiva. Gli enzimi che catalizzano le due reazioni sono sensibili all'azione degli ormoni (vedere a,b,c,d),
- 2) per azione di effettori positivi (AMP) e negativi (G6P, ADP e glucosio).

L'azione del glucosio è particolare perchè agisce solo sull'enzima fosforilato stabilizzando la forma inattiva (fosforilata), ed in questo modo favorisce anche la defosforilazione dell'enzima rendendolo più affine alla proteina fosfatasi. Questo è un caso particolare perchè l'azione dell'effettore si oppone e prevale sull'azione dell'ormone.

Si assume che le tre forme di enzima inattivo e le due forme di enzima attivo, differiscano rispettivamente tra loro per piccole differenze strutturali (per spiegare le differenti sensibilità della molecola enzimatica agli effettori).

L'enzima attivato da AMP e per fosforilazione, può polimerizzare a tetramero che ha solo il 12-33% di attività dell'enzima fosforilato. Il tetramero è dissociato in dimeri attivi quando si associa al glicogeno. Poichè nella cellula l'enzima è in gran parte associato al glicogeno, si ritiene che la forma fisiologica dell'enzima sia la forma monomerica.

Le azioni dei quattro effettori permettono una precisa disciplina dell'uso del glucosio (ematico) e del glicogeno a fini energetici, dando la precedenza all'utilizzazione del glucosio ematico rispetto al glicogeno contenuto nella cellula stessa. L'azione del glucosio su glicogeno-fosforilasi-a conferma la preferenza dell'utilizzazione del glucosio ematico perchè è un caso particolare di regolazione. Il glucosio effettore si impone all'azione ormonale è un caso particolare di regolazione, si osserva più frequentemente il caso opposto (vedere (a)). La Natura non ha scrupoli a fare eccezioni, come in questo caso, se la regolazione funziona meglio, il meccanismo è selezionato positivamente.

La C_{ss}-AMP aumenta quando la C_{ss}-ATP decresce (o viceversa). La concomitanza dei due meccanismi operati dai due effettori su conformazioni diverse (insiemi diversi di molecole) dello stesso enzima, rende più veloce lo spostamento di equilibrio e quindi il meccanismo di regolazione. Questo perchè la velocità di associazione dei complessi PL è molto più alta della sua dissociazione (vedere Cap.2). Quindi il doppio meccanismo rende più veloce e quantitativamente maggiore lo spostamento di equilibrio nei due sensi rispetto a quello che si avrebbe per semplice variazione di un solo effettore. Ad esempio, con un incremento della C_{ss}-ATP, l'inibizione dell'enzima è più veloce della sua disinibizione per riduzione della C_{ss}-ATP. Ciò è ovviato dalla concomitante

attivazione dello stesso enzima per associazione di AMP. Con lo stesso principio funziona, in senso opposto, il meccanismo che opera l'inibizione dell'enzima. La funzione fisiologica della attivazione ormonale della glicogeno-fosforilasi è descritta in questa figura (a) e nelle figg. 7-11+14, 7-22 e la funzione fisiologica degli effettori nelle figg. 7-1+3, 7-5-8, 7-20+22.

f)

Metabolismo dei recettori dell'insulina nelle cellule epatiche. (da Balander, ridisegnato e modificato).

I recettori degli ormoni possono essere divisi in tre classi:

1. Recettori che interagiscono con le proteine che legano GTP (proteine G) come i recettori α e β adrenergici, e del glucagone.
2. Recettori con attività tirosina-cinasica, come il recettore dell'insulina, del fattore di crescita epidermico (EGF), fattore di crescita simile all'insulina (IGF), fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), ed il fattore stimolante, i macrofagi (MCSF).
3. Recettori che formano canali ionici per il sodio (recettori per l'acetil-colina nelle cellule nervose e muscolari e per il cloro (recettori per l'acido γ -aminobutirrico e per la glicina).

Quando l'ormone si lega al recettore, il complesso ormone-recettore viene metabolizzato. Cioè, subisce una serie di passaggi che portano il complesso all'interno della cellula (endocitosi), il complesso viene dissociato, l'ormone distrutto ed il recettore riciclato, cioè riportato sulla membrana plasmatica. Questo meccanismo è stato dimostrato per l'insulina, per il fattore di crescita per le cellule nervose (NGF), per l'EGF, per i trasportatori di sostanze nutrienti (es. transferrina legata al ferro) e per le lipoproteine a bassa densità (LDL), che trasportano colesterolo ed acidi grassi, per fattore intrinseco, trasportatore della vitamina B12.

Il meccanismo per gli ormoni non è identico nel dettaglio a quello per le sostanze nutrienti, ma molto simile.

L'insulina si lega ai recettori posti sulla membrana plasmatica, i complessi ormone-recettore ed anche recettori liberi, tendono a raggrupparsi in una depressione della membrana che è rivestita da uno strato di clatrina. La clatrina è una proteina costituita da due subunità, una pesante (N) di 180 KD, ed una leggera (L) di 35 KD. La clatrina forma trimeri (triskelion) che si dispongono in maniera ordinata sulla superficie interna della depressione formando pentameri ed esameri (vedere figura). La depressione si chiude e forma una vescicola rivestita di clatrina, successivamente la vescicola perde la clatrina, diventa un recettosoma (o endosoma). Il recettosoma può associare una vescicola formando dei tubuli sottili (per alcuni autori è l'endosoma stesso che forma i tubuli), la nuova struttura è detta CURL (Compartment for Uncoupling Receptors and Ligands). Il CURL si acidifica al suo interno mediante un meccanismo che richiede energia (ATP), e ciò provoca la dissociazione tra ormone e recettore. I recettori liberi dall'ormone rimangono associati alla membrana del

tubulo, mentre l'insulina rimane nella vescicola. La vescicola si fonde con un lisosoma ed in questo viene degradata l'insulina.

Il motivo per cui i recettori migrano nell'apparato del Golgi, è oscuro. Forse subiscono delle riparazioni, o sono purificati da componenti di membrane che possono aver trascinato con loro, o forse sono temporaneamente conservati. Successivamente dall'apparato del Golgi i recettori ritornano sulla membrana plasmatica.

Il metabolismo descritto è quello dei recettori per l'insulina posti sulle membrane degli epatociti, mentre i recettori per l'insulina posti negli adipociti vengono distrutti insieme all'ormone e non riciclati. Questa distruzione può servire a rendere, per un certo tempo, insensibili all'ormone gli adipociti che hanno ricevuto l'azione dello stesso ormone.

Il significato del metabolismo dei recettori è tuttora discusso. Cioè se esso abbia solo la funzione di distruggere l'ormone e riciclare i recettori, o se l'internalizzazione del complesso ormone-recettore sia necessaria perché il complesso eserciti la sua azione direttamente nel citoplasma.

L'aggregazione dei recettori è in genere indotta dall'ormone o fattore di crescita che si lega al recettore, ma ciò non sembra il caso dell'insulina (e neppure di proteine che trasportano nutrienti). Nel caso dell'insulina i recettori sono riciclati anche se non hanno legato il rispettivo legante.

L'insulina stimola l'utilizzazione massima del glucosio negli adipociti legandosi solamente al 2% dei recettori. Simili percentuali di saturazione sono state riscontrate per il glucagone e le catecolamine. I rimanenti recettori sono detti di riserva. La funzione dei recettori di riserva è tuttora discussa. Secondo una ipotesi, l'azione dell'ormone sarebbe diversa in relazione alla percentuale dei recettori saturati. Questa ipotesi è scaturita dal fatto che alcune azioni dell'insulina (incremento del trasporto del glucosio e della sua ossidazione, inibizione della lipolisi, riduzione della fosforilazione delle proteine nelle cellule competenti) sono realizzate con una bassa saturazione di recettori (2%), mentre altre azioni (stimolazione della sintesi del glicogeno e delle proteine, delle attività acetil-CoA carbossilasica, piruvato-deidrogenasica, tirosina-aminotransferasica), avvengono a saturazioni maggiori dei recettori.

Secondo un'altra ipotesi i recettori di riserva avrebbero la funzione di modulare la sensibilità della cellula all'ormone stesso. Più recettori di un dato ormone sono presenti nella cellula e minori concentrazioni di ormone sono necessarie per formare un dato numero di complessi ormone-recettore e quindi provocare l'azione ormonale sulla cellula.

A favore di questa seconda ipotesi, c'è la conoscenza della presenza nella cellula di recettori nascosti (non legano il rispettivo ormone), che attraverso meccanismi ancora non definiti, possono essere liberati nel citoplasma e posti sulla membrana plasmatica in tempi brevissimi. Questi recettori proverrebbero dall'apparato del Golgi o da precursori inattivi (diverrebbero attivi con poche reazioni:

proteolisi od altre reazioni covalenti). La cellula possedendo un numero maggiore di recettori, per legge di azione di massa, diviene più sensibile al relativo ormone. Uno stesso ormone può avere più specie molecolari di recettore. Questi recettori sono detti isorecettori e spesso hanno diversa distribuzione tissutale e/o diversi secondi messaggeri e funzioni diverse (vedere recettori delle catecolamine, fig. 7-10).

a) Fig. 7-9

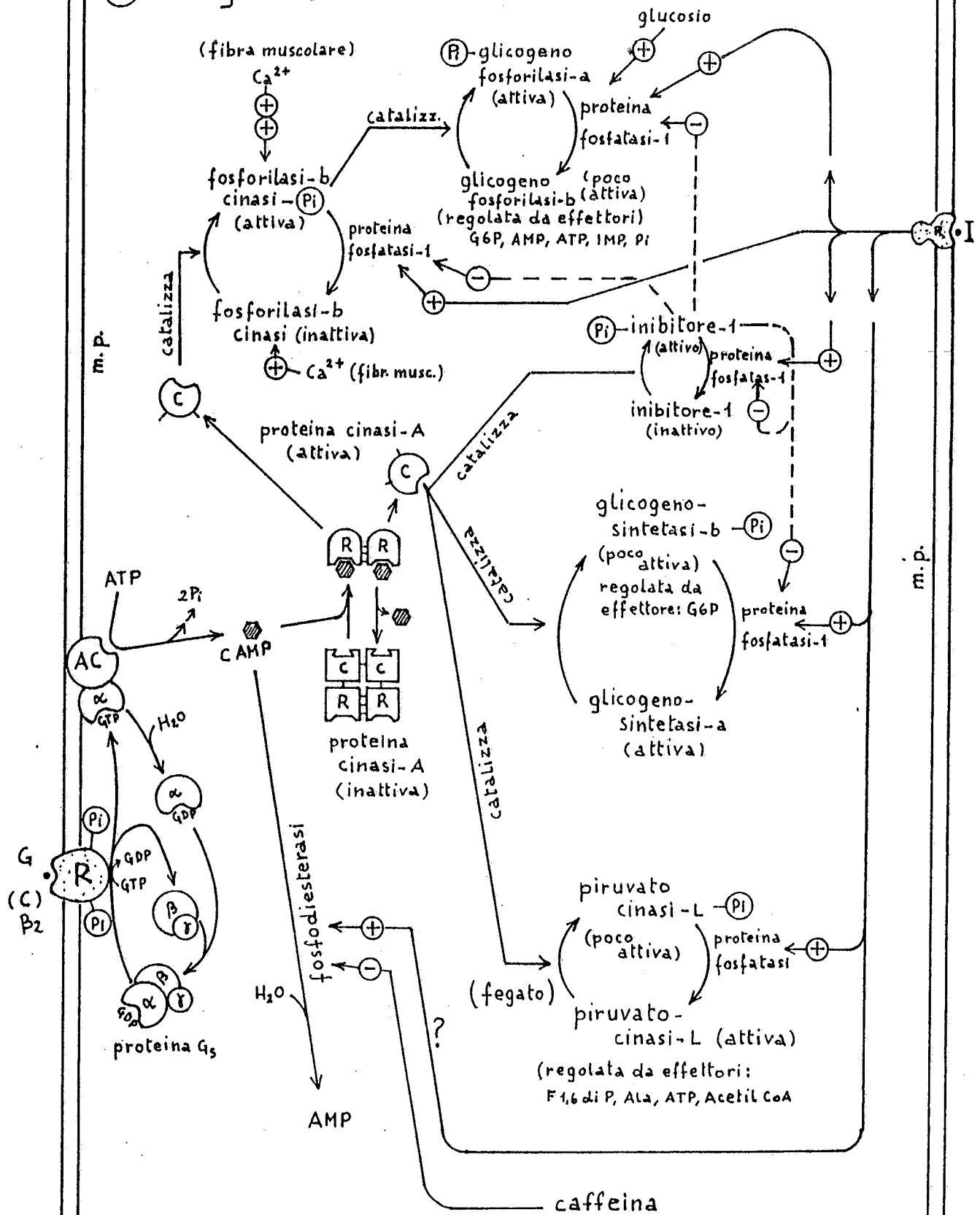


Fig. 7-9

(b)

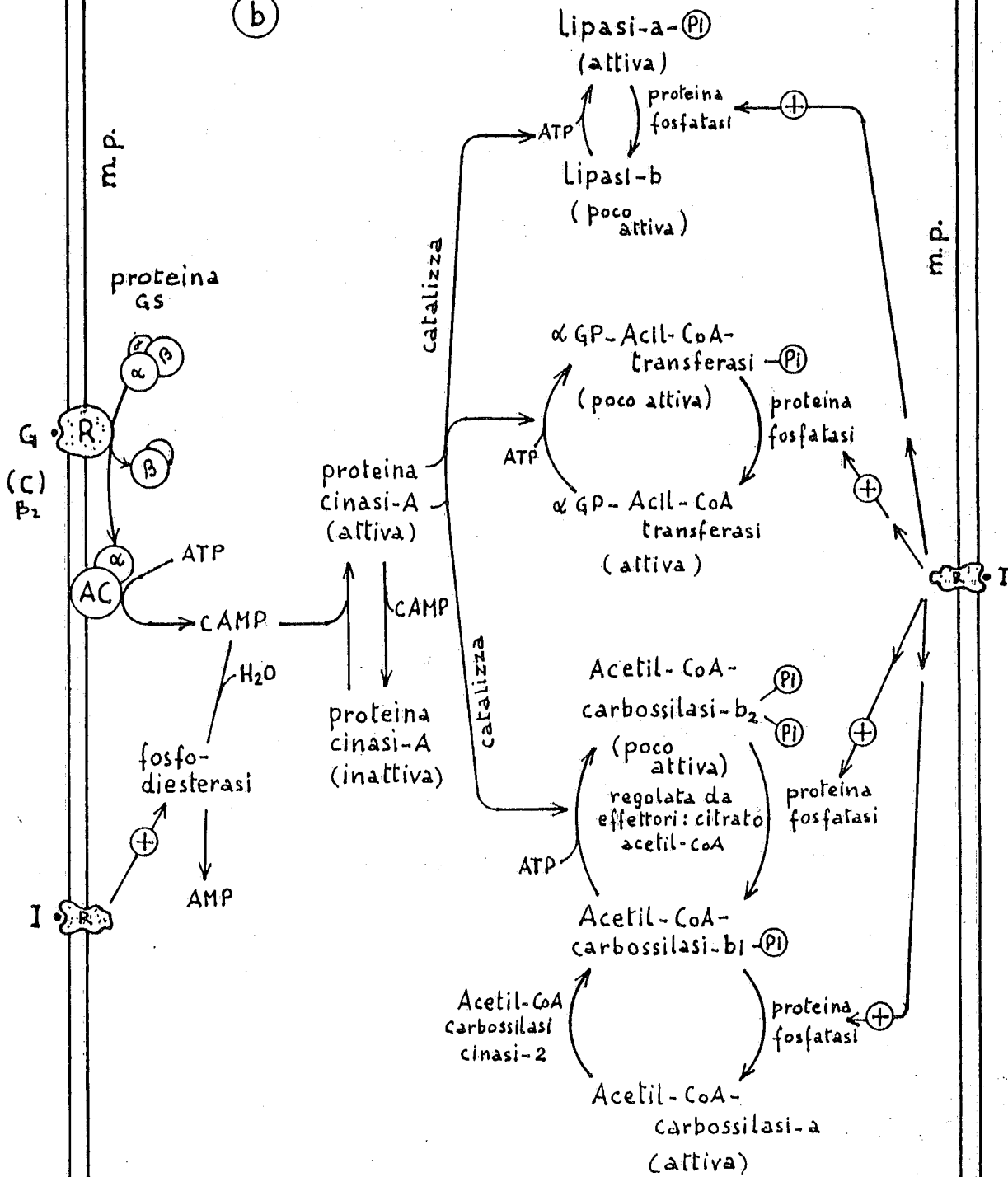
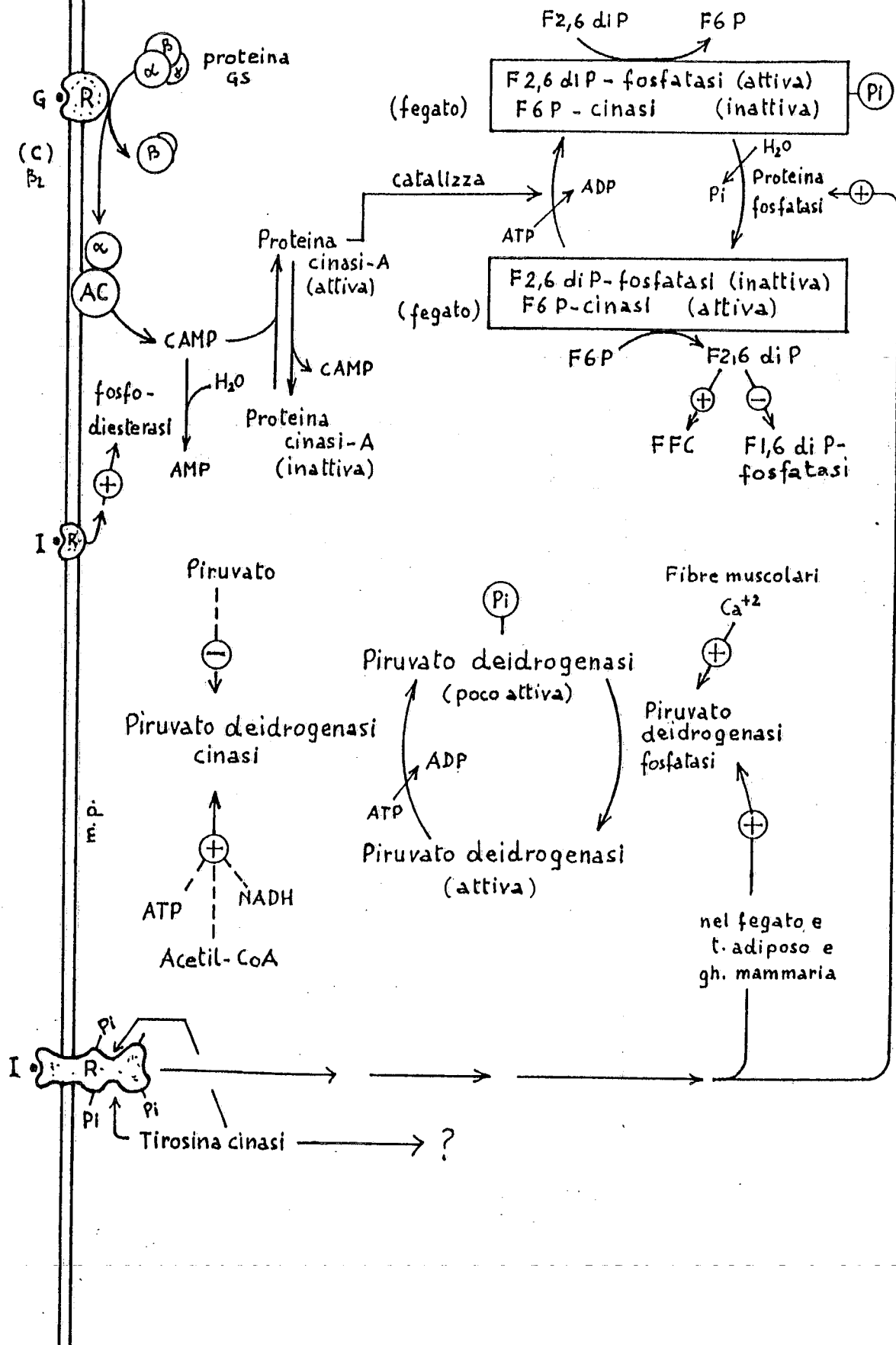
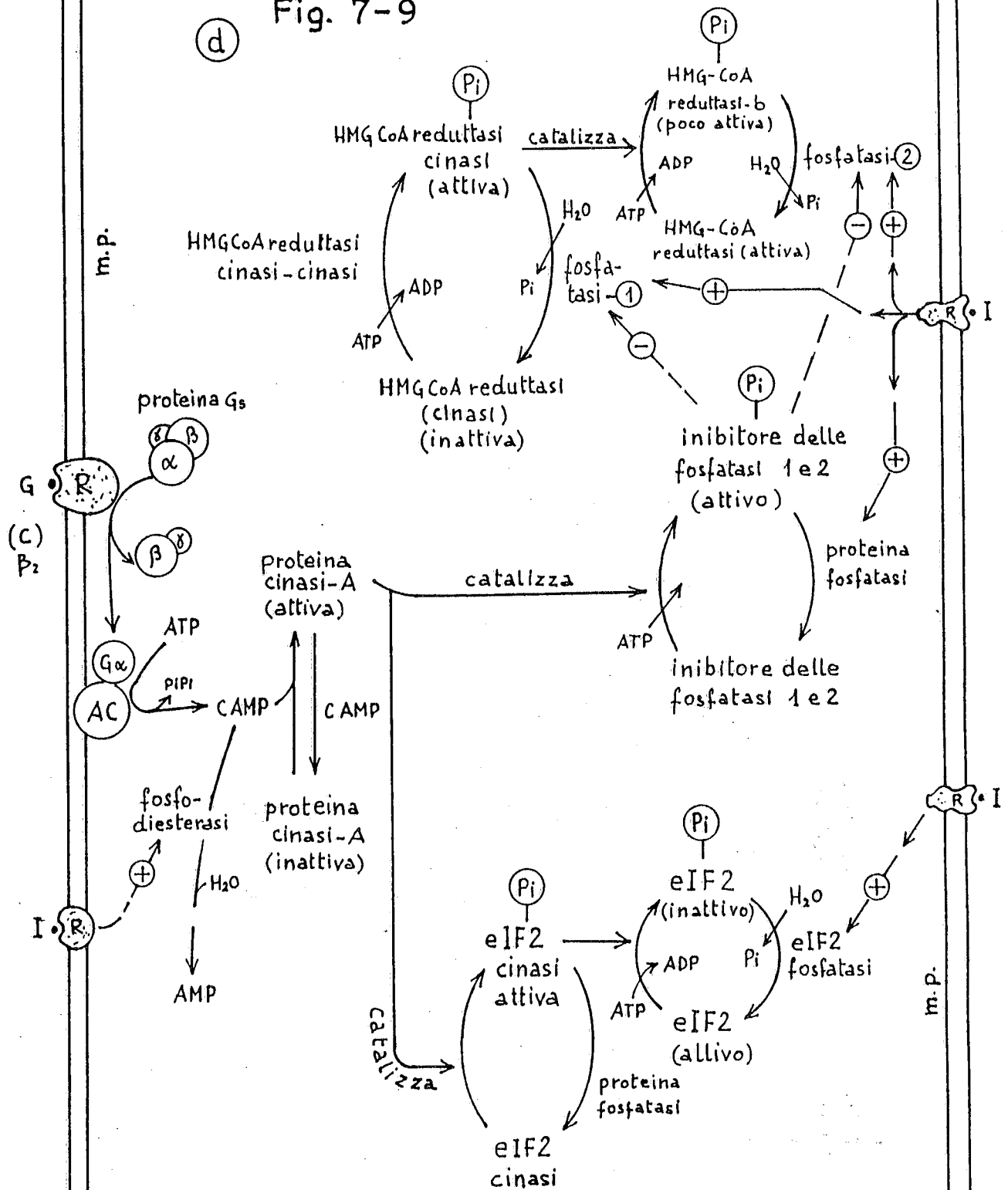


Fig. 7-9 (C)



(d) Fig. 7-9



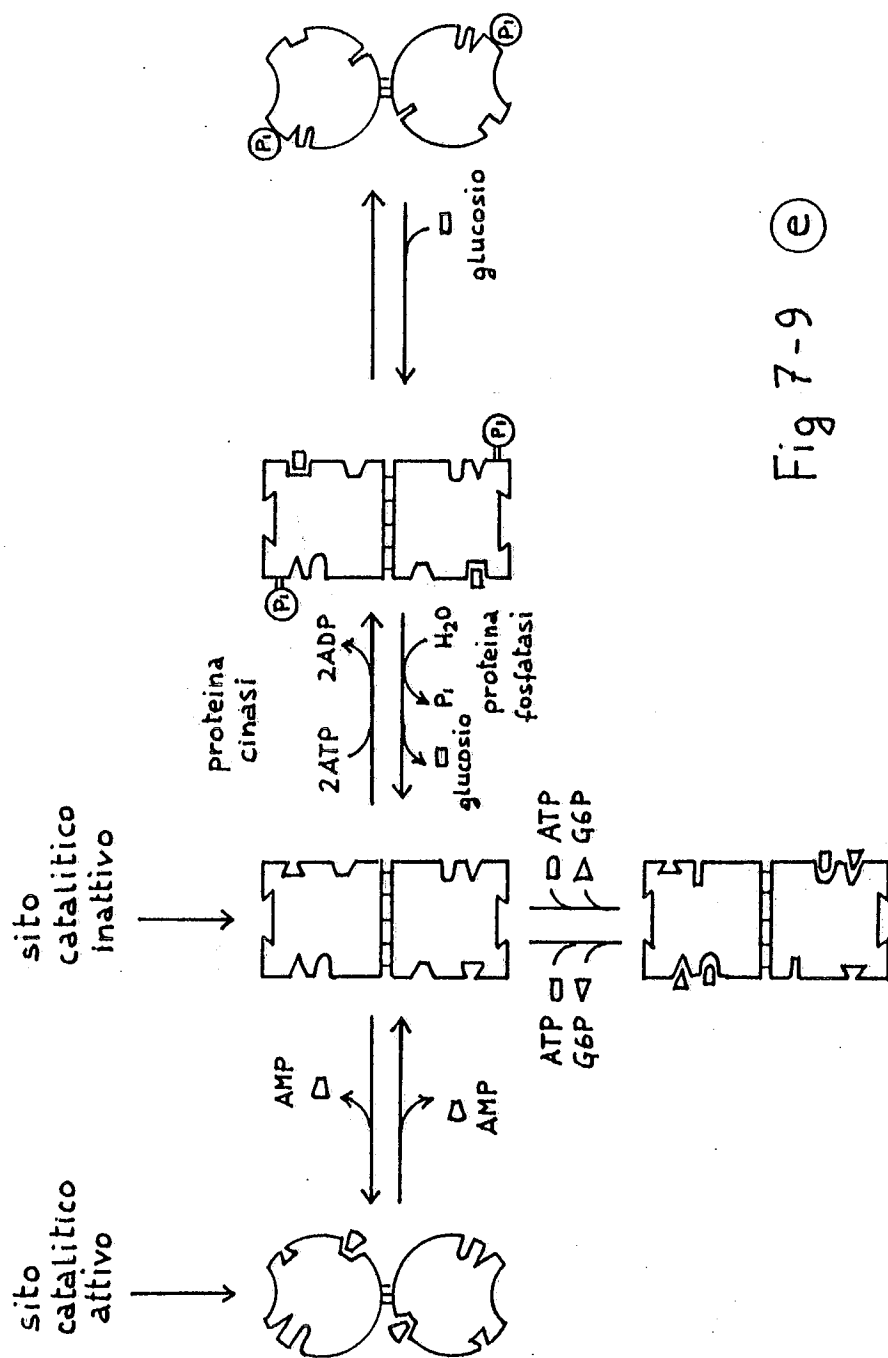


Fig 7-9 (e)

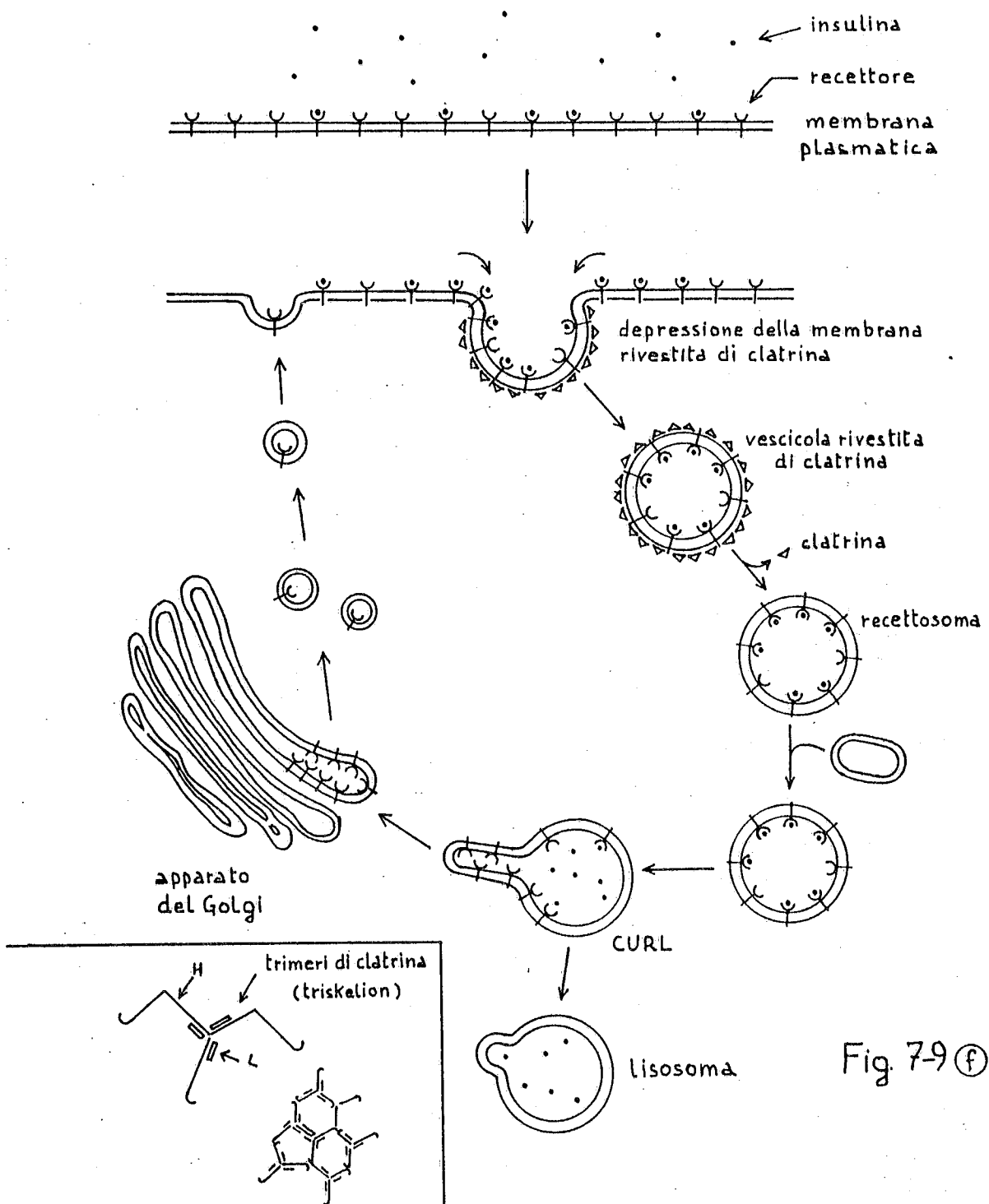


Fig. 7-10

Meccanismo d'azione degli ormoni che hanno inositolo-trifosfato (IP_3) e diacilglicerolo (DAG) come messaggeri intracellulari.

In figura è schematizzato il meccanismo molecolare d'azione dell'adrenalina che opera legandosi ai recettori β_1 -adrenergici degli epatociti.

Il meccanismo d'azione proposto non è completamente chiarito in tutti i suoi dettagli. Le prove, che la proteina-G sia un intermedio del meccanismo molecolare, sono indirette (inibitori della proteina-G bloccano l'attivazione ormonale); e sono indirette le prove indicanti che la proteina cinasi-C catalizzi la fosforilazione della glicogeno fosforilasi-b. Anche il luogo di idrolisi del PIP_2 è discusso, se all'interno della membrana (come in figura) o sulla superficie interna della membrana.

Le azioni del IP_3 e del DAG provocano effetti diversi in cellule diverse (es. "contrazione" nei muscoli lisci, "secrezione dell'adrenalina" nelle cellule cromaffini, ecc.).

Il complesso ormone-recettore attiva la proteina G (che si assume abbia la subunità α diversa da quella della proteina-G che attiva l'enzima adenilato ciclasi), catalizzando lo scambio GDP-GTP (come visto per gli ormoni che operano via cAMP, fig. 7-9).

La subunità $G\alpha$ attiva una fosfolipasi (detta C), che è specifica per il fosfatidil-inositolo 4,5 bifosfato (PIP_2). L'enzima è anche chiamato fosfoinositidasi o polifosfoinositide fosfodiesterasi). L'enzima è associato alla membrana plasmatica ed idrolizza il PIP_2 liberando inositolo 1,4,5 trifosfato (IP_3) e diacilglicerolo (DAG) che sono i secondi messaggeri intracellulari dell'ormone.

IP_3 causa il rilascio di ioni Ca^{2+} dal deposito intracellulare, che nel fegato è il reticolo endoplasmatico (r.e.). L'incremento della concentrazione del Ca^{2+} ha più effetti, stimola la glicogenolisi e la gluconeogenesi ed inibisce la glicogeno sintesi.

Il Ca^{2+} ha una azione diretta di attivazione della glicogeno fosforilasi-b cinasi e stimola la gluconeogenesi. Non si conosce su quali enzimi della gluconeogenesi e/o della glicolisi eserciti la sua azione il Ca^{2+} .

Il Ca^{2+} esercita gli altri effetti attivando sinergicamente con il DAG una proteina cinasi che fosforila la glicogeno sintetasi-a, rendendola inattiva o meno attiva.

Il DAG aumenta l'affinità della proteina cinasi-C per il Ca^{2+} , per cui rende l'enzima attivabile da concentrazioni fisiologiche (relativamente basse) dello ione. La proteina cinasi-C inattiva è libera nel citoplasma, quando associa DAG ed il Ca^{2+} diviene cataliticamente attiva e si lega alla membrana plasmatica.

Il meccanismo d'azione che ha come 2° messaggero IP_3 ha molte caratteristiche del meccanismo ormonale che ha come 2° messaggero il cAMP descritto in fig. 7-9.

In particolare ha:

1) amplificazione del segnale a livello della proteina G, delle reazioni catalizzate da fosfolipasi-C e proteina-

cinasi-C, rilascio del Ca^{2+} (molti ioni Ca^{2+} /molecola IP_3), della proteina cinasi; 2) la rapida reversibilità. IP_3 in pochi secondi perde la caratteristica di messaggero; è sufficiente una reazione che idrolizza il gruppo fosforico in posizione 5. L'inositolo può essere riutilizzato per la sintesi di fosfatidil-inositolo (PI).

Anche il DAG perde la caratteristica di messaggero se viene fosforilato ad acido fosfatidico che è un intermedio della sintesi dei fosfolipidi.

Il DAG può anche essere idrolizzato a glicerolo e due acidi grassi. In genere PIP_2 (e quindi il DAG) ha in posizione 2 l'acido arachidonico, acido grasso essenziale a 20 atomi di C polinsaturo, che è precursore delle prostaglandine, composti simili agli ormoni, che hanno la funzione di regolare la fisiologia cellulare. Si assume che l'idrolisi del PIP_2 possa avere un ruolo anche nella regolazione della sintesi delle prostaglandine.

Sommario dei isorecettori adrenergici:

- 1) adrenergici - 2° messaggero: IP_3 e DAG
 - α_1 - fegato-incremento del Ca^{2+} -glicogenolisi
 - α_2 - riduzione delle C_{ss}-cAMP via Gi
- 2) adrenergici - 2° messaggero: cAMP
 - β_1 - recettori del cuore. L'adrenalina e la nor-adrenalina hanno la stessa affinità per questi recettori.
 - β_2 - recettori di tutti i tessuti (cuore escluso). L'adrenalina è 10 volte più affine della nor-adrenalina a questi recettori.

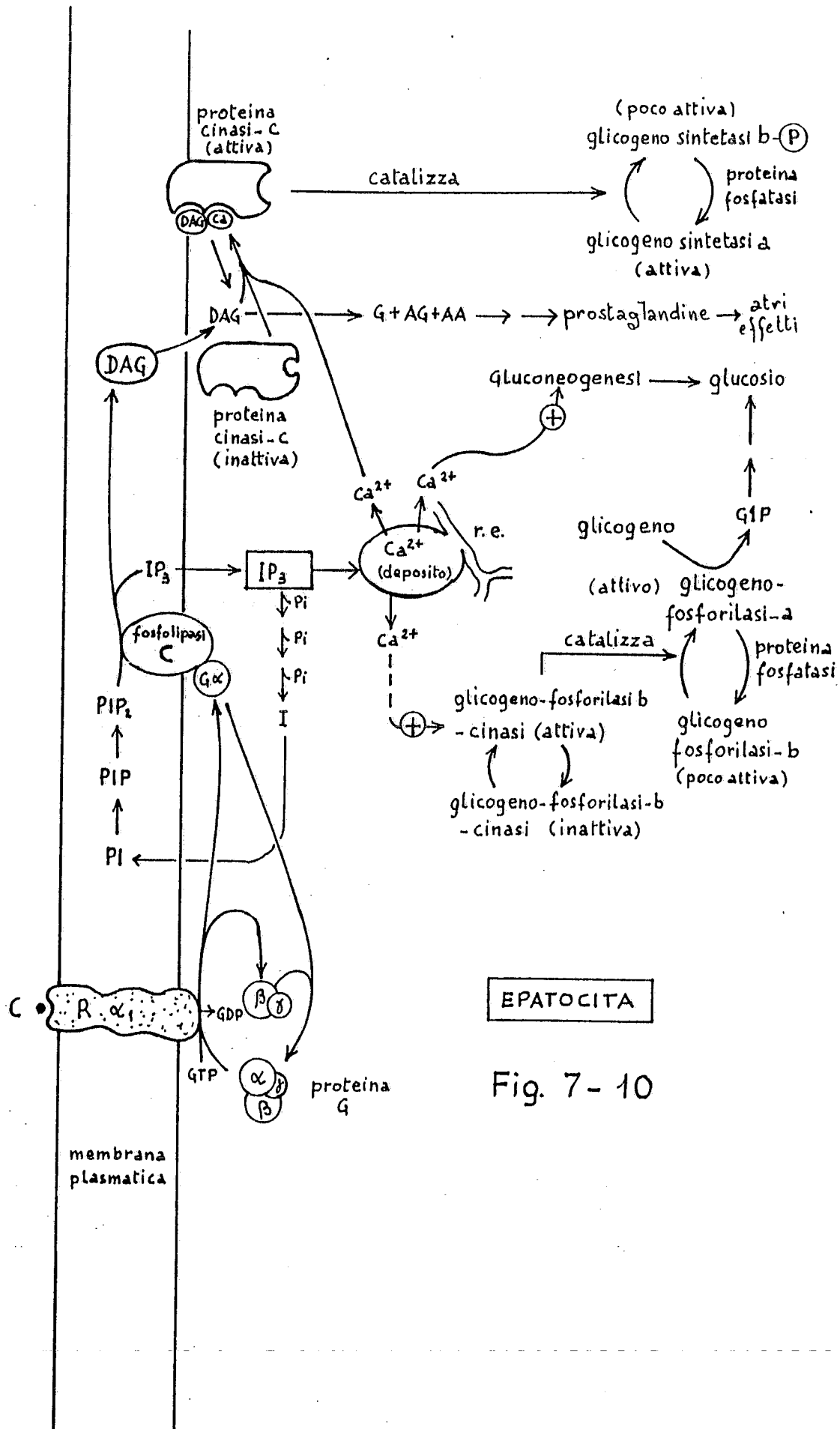


Fig. 7-11

Schema delle relazioni metaboliche tra organi di un organismo (uomo) in tre differenti condizioni metaboliche.

Sono indicate solo le vie che hanno un ruolo nel metabolismo energetico, incluse le sintesi di composti di deposito e la sintesi proteica. Schemi più dettagliati della regolazione del metabolismo energetico sono descritti nelle figure 7-12+7-13 (fegato) e nelle figure 7-20+7-21 (muscolo).

Gli schemi hanno lo scopo di mostrare come le relazioni metaboliche tra organi siano coordinate dagli ormoni che sono secreti nelle diverse condizioni metaboliche.

La regolazione ormonale è indicata in tratteggio; in tratto e punto sono indicate le vie metaboliche che procedono con velocità inferiore relativamente a quelle indicate con tratto continuo.

Le frecce che entrano nel tessuto indicano che il metabolita è importato dal sangue e che nella cellula è convertito nei composti indicati con un'altra freccia. Lo stesso metabolita è anche ossidato per produrre ATP, l'utilizzazione dei metaboliti a fini energetici non è indicata in figura.

Il segno di attivazione di una via metabolica può risultare da una attivazione degli enzimi della stessa via o per inibizione della via opposta (es. gluconeogenesi stimolata per inibizione della glicolisi).

a) Condizione di alimentazione con carboidrati, lipidi e proteine dopo circa 12 h di digiuno. L'incremento della glicemia causa la riduzione delle C_{ss}-glucagone e l'aumento della C_{ss}-insulina nel sangue. Queste variazioni delle C_{ss} dei due ormoni, stimolano tutte le sintesi (escluso gluconeogenesi e sintesi dei corpi chetonici). Con l'alimentazione vengono ripristinate le riserve energetiche e le proteine degradate nel digiuno per alimentare con aminoacidi la gluconeogenesi. Nel digiuno tutte le cellule di tutti gli organi (tessuto nervoso incluso) degradano una frazione delle proprie proteine, che risintetizzano con la rialimentazione (vedi b). In figura la sintesi proteica è indicata solo nel fegato e T. muscolare scheletrico, perché in questi organi avviene in maggiore quantità in relazione al maggiore catabolismo proteico di questi stessi organi durante il digiuno; inoltre il trasporto di aminoacidi all'interno degli epatociti e delle fibre muscolari è stimolato dall'insulina, che in particolare stimola nel muscolo l'assunzione degli aminoacidi valina, leucina ed isoleucina (detti aminoacidi ramificati).

Il fegato sintetizza la sua riserva di glicogeno da glucosio in relazione ai livelli della glicemia, e quindi in dipendenza all'utilizzazione del glucosio ematico da parte degli altri tessuti, dato che l'insulina stimola il trasporto di glucosio nel muscolo e tessuto adiposo, ma non nell'epatocita. In relazione alla disponibilità di glucosio nel sangue, il fegato sintetizza acidi grassi e trigliceridi che esporta nel sangue. Questi composti verranno importati dal tessuto adiposo. Gli acidi grassi sono importati anche dal T. muscolare scheletrico e cardiaco. Il tessuto adiposo sintetizza trigliceridi da acidi grassi ematici (provenienti dalla dieta o sintetizzati dal fegato) e li sintetizza da

glucosio (neolipogenesi).

Con la rialimentazione dopo il digiuno, il tessuto muscolare non sintetizza glicogeno perchè la riserva di glicogeno nelle fibre rimane intatta se queste non si sono contratte (es. digiuno durante il riposo notturno).

Il glicogeno è una riserva solo per la fibra che lo contiene, ed è utilizzato esclusivamente per la contrazione (vedere fig. 7-22). Se durante il periodo di digiuno il muscolo si è anche contratto anaerobicamente, ha degradato proteine per alimentare la gluconeogenesi epatica e glicogeno per contrarsi, quindi con la rialimentazione attiva sia la sintesi di proteine che quella di glicogeno. Se il muscolo proviene da uno sforzo prolungato nel tempo (es. maratona) attiva la sintesi delle proteine, del glicogeno e delle piccole riserve di trigliceridi (questa condizione metabolica è quella indicata in figura).

Il cuore ha un metabolismo aerobico ed utilizza la sua riserva di glicogeno e di trigliceridi quando raggiunge i valori massimi di frequenza di battiti (vedere c). Si assume che ciò avvenga solo in condizioni particolari come nello sport e raramente nella vita quotidiana. Si assume che se il cuore, per contrarsi rapidamente, utilizza le proprie riserve di glicogeno e trigliceridi, quando la frequenza cardiaca torna a valori normali, il cuore riesce ugualmente a ristabilire le sue riserve energetiche utilizzando glucosio ed acidi grassi ematici, anche se l'organismo è in condizioni di digiuno. Con l'alimentazione queste sintesi avvengono più rapidamente.

Le cellule della parete intestinale utilizzano a fini energetici glutamina ed aspartato e glucosio.

Il rene è qui considerato globalmente, mentre la cortex (aerobica) e la medulla (anaerobica) hanno metabolismi diversi. Il rene in toto utilizza sempre glucosio ed acidi grassi, e se c'è disponibilità di aminoacidi li riconverte in glucosio che esporta nel sangue. Il tessuto nervoso in condizioni di glicemia normale utilizza a fini energetici il 100% di glucosio e l'entrata del glucosio nelle cellule nervose non è stimolata dall'insulina.

La stimolazione generale delle sintesi che avviene con l'alimentazione, è condizionata alla secrezione di insulina e quindi ad una dieta che includa carboidrati in quantità sufficienti da causare un incremento della glicemia. Se nella dieta mancano i carboidrati, anche se l'apporto calorico è in eccesso, non si ha l'incremento di secrezione di insulina e quindi manca lo stimolo alle sintesi. In questa condizione (dieta ipoglucidica) la glicemia è mantenuta mediante la gluconeogenesi epatica e renale come se continuasse il digiuno. La gluconeogenesi sarà alimentata da aminoacidi provenienti dalle proteine della dieta e la presenza di aminoacidi farà risparmiare aminoacidi provenienti dalla degradazione delle proteine di tutti i tessuti, e quindi si assume che la degradazione delle proteine rallenti. Il glicogeno epatico è risintetizzato da glucosio neoglucogenetico ed il glicogeno muscolare dal glucosio ematico che ha la stessa origine. Il tessuto adiposo sintetizzerà trigliceridi da acidi grassi e da glucosio ematico, ma più lentamente a causa della bassa C_{ss}-insulina.

Con l'assorbimento di un pasto scarso in glucidi il quadro metabolico del fegato cambia relativamente poco, per il fatto che la glicemia non si alza tanto da stimolare la secrezione di insulina, come avviene con un pasto contenente carboidrati; quindi il fegato rimane sotto controllo del glucagone fino a quando la glicemia rimane a livelli bassi. Ciò sembra essere indicato anche dall'osservazione che gli aa stimolano la secrezione di insulina solo in presenza di glucosio. Quindi se la glicemia non aumenta, l'effetto degli aa sul rilascio dell'insulina non è o è poco esercitato.

b) Condizioni di digiuno. La glicemia si abbassa, per cui nel sangue la C_{ss}-glucagone si alza e la C_{ss}-insulina si abbassa.

Con punteggiatura sono indicati gli effetti di attivazione per riduzione degli effetti di inibizione dell'insulina, con tratteggio sono indicati gli effetti dell'azione del glucagone. Con "i" si indica un effetto indiretto del glucagone (per altre indicazioni vedi inizio della didascalia).

La glicemia viene mantenuta dal fegato che esporta glucosio prodotto dalla degradazione del glicogeno e dalla sintesi di glucosio da composti non glucidici (gluconeogenesi). La gluconeogenesi epatica è stimolata dal glucagone, ed è alimentata con aminoacidi provenienti nella prima ora, dalla degradazione delle proteine epatiche, e nelle ore successive da quella delle proteine del tessuto muscolare scheletrico. La gluconeogenesi renale non è attivata dall'azione del glucagone, ma si ritiene che in condizioni di digiuno, il rene produca più glucosio gluconeogenetico in relazione alla maggiore utilizzazione di glutamina. La glutamina è metabolizzata al fine di liberare da essa due molecole di ammoniaca e tamponare con esse l'acidità del sangue provocata dai corpi chetonici. Lo scheletro carbonioso della glutamina è poi utilizzato per la sintesi di glucosio. Nel digiuno è stimolata la lipolisi nel tessuto adiposo e nel fegato (per decremento dell'insulina e nel fegato anche per azione del glucagone), per cui c'è un incremento della C_{ss}-acidi grassi nel sangue, ed il fegato incrementa la sintesi dei corpi chetonici che vengono liberati nel sangue. In un uomo che digiuna, dopo un giorno la C_{ss}-corpi chetonici nel sangue aumenta di circa 10 volte), dopo tre giorni di 90 volte, e continua a crescere anche dopo una settimana.

Tutti gli organi, incluso il tessuto nervoso, utilizzano corpi chetonici durante il digiuno. Dopo un giorno di digiuno il tessuto nervoso utilizza a fini energetici il 10% di corpi chetonici ed il 90% di glucosio, dopo 30-45 giorni fino al 30% di corpi chetonici e 70% di glucosio. In queste condizioni il tessuto nervoso non utilizza acidi grassi (non passano la barriera emato-encefalica) che invece sono utilizzati da tutti i tessuti. Gli acidi grassi sono utilizzati scarsamente dalle cellule intestinali, che per produrre ATP ossidano glutamina e corpi chetonici. I globuli rossi (non indicati in figura) non avendo mitocondri, producono ATP anaerobicamente e possono utilizzare esclusivamente glucosio.

Evoluzione del metabolismo nei tessuti durante il digiuno.
1^a fase (post-assorbimento).

Inizia alcune ore dopo il pasto, quando il contenuto dell'intestino tenue è stato assorbito e dura per un pasto normale 3-4 h (permane circa 6-8 h dopo il pasto).

Questa fase, detta anche del post-assorbimento, termina con un altro pasto o con l'inizio del vero digiuno.

Verso la fine della 1^a fase, nel sangue si ha la riduzione della C_{ss}-glucosio (riduzione del 13%) e quindi anche della C_{ss}-insulina (riduzione del 70%). Ciò causa una riduzione dell'utilizzazione del glucosio da parte di tutti i tessuti, incluso il fegato, e l'attivazione della glicogenolisi ed inibizione della glicogenosintesi epatica. La glicemia è mantenuta dal glicogeno epatico. Il glucosio ematico è risparmiato da parte di tutti i tessuti, perchè lo stimolo dell'insulina alla diffusione del glucosio nelle cellule ed alle sintesi, è fortemente ridotto a causa della riduzione della C_{ss}-insulina nel sangue.

2^a fase.

Inizio del vero digiuno. Inizia dopo la 1^a fase e dura circa un giorno dall'ultimo pasto. Si ha una ulteriore riduzione della glicemia e della C_{ss}-insulina, mentre la C_{ss}-glucagone aumenta. Questa fase è caratterizzata dal rilascio nel sangue di glucosio da parte del fegato e di acidi grassi del tessuto adiposo. La mobilitazione degli acidi grassi è causata dal decremento della C_{ss}-insulina che causa una riduzione dell'inibizione delle lipasi del tessuto adiposo e non attiva più la sintesi di acidi grassi e trigliceridi. Il glucagone nell'uomo non agisce nel tessuto adiposo (come avviene invece nel topo), mentre nel fegato il glucagone stimola la lipolisi e la glicogenolisi.

L'aumento della C_{ss}-acidi grassi nel sangue causa un ulteriore risparmio di glucosio, perchè i tessuti (eccetto il T. nervoso, globuli rossi ed altre cellule anaerobiche) utilizzano acidi grassi e, con la regolazione da effettori (fig. 7-8), rallentano la glicolisi. Il fegato, utilizzando acidi grassi della propria riserva ed esogeni, soprattutto nella fase terminale di questa 2^a fase, attiva la sintesi dei corpi chetonici. La C_{ss}-corpi chetonici aumenta di circa 10 volte rispetto ad una persona alimentata e di circa 4 volte rispetto alla fase 1^a. Durante questa fase il fegato attiva la gluconeogenesi, perchè il glucosio prodotto dalla degradazione del glicogeno epatico diviene insufficiente a sostenere la glicemia. La gluconeogenesi utilizza acido lattico, α GP ed aminoacidi provenienti dalle proteine del fegato stesso e del tessuto muscolare, ed ha un'alta attività, 118 g di glucosio in 24 h, di cui 60 g da aminoacidi.

La degradazione delle proteine si assume che inizi con la riduzione della C_{ss}-insulina, cioè con una riduzione dell'attivazione del eIF₂. Nel fegato questo effetto è reso più rapido dall'azione del glucagone, che invece non agisce sul tessuto muscolare.

Si ritiene che l'insulina abbia anche un'azione negativa sulle proteasi cellulari, per cui la riduzione della C_{ss}-insulina favorisce la degradazione delle proteine, ed in questo effetto di attivazione delle proteasi è associata anche l'azione dei glucocorticoidi.

La demarcazione tra la 1^a e la 2^a fase non è netta, e bisogna assumere che già al termine della 1^a fase avvengano con minore entità i fenomeni che caratterizzano la 2^a. Infatti, già nella 1^a fase si ha nel sangue il raddoppio della C_{ss}-acidi-grassi e dei corpi chetonici, e quindi si assume che sia attiva anche la gluconeogenesi.

3^a fase.

Digiuno dal 2° al 3° giorno dall'ultimo pasto. Si ha un ulteriore decremento della glicemia, della C_{ss}-insulina (che è solo il 4% di quella dell'uomo alimentato e circa il 50% della C_{ss} della 2^a fase); La C_{ss}-glucagone aumenta del 50% rispetto a quella della fase 2^a.

In questa fase si ha ancora un'attiva gluconeogenesi (circa 106 g di glucosio sono sintetizzati in 24 h dal fegato e rene, e di questi, 48 g derivano da amino acidi) e una attiva sintesi dei corpi chetonici.

4^a fase.

Digiuno dal 4° al 24° giorno. Questa fase è caratterizzata da una riduzione della gluconeogenesi (74 g di glucosio/24 h di cui 16 g prodotti da aminoacidi) e da un forte incremento della sintesi dei corpi chetonici e della loro C_{ss} ematica che è 3+4 volte più alta di quella della fase 3^a e fino a 28 volte più alta della fase 2^a, mentre la glicemia rimane costante con valori vicini a quelli della 3^a fase.

E' proprio il forte incremento nel sangue delle C_{ss}-corpi chetonici che causa una riduzione della gluconeogenesi. Il tessuto nervoso, che utilizza grandi quantità di glucosio, può sostituire gran parte del glucosio con i corpi chetonici solo quando la C_{ss}-corticetoniche nel sangue raggiunge alti valori. La sostituzione avviene per regolazione da substrato (non da effettori, nè da ormoni). Gli enzimi che catalizzano le reazioni di utilizzazione dei corpi chetonici nel tessuto nervoso hanno la stessa attività massima nel digiuno e nell'organismo alimentato.

L'utilizzazione dei corpi chetonici da parte del tessuto nervoso, riduce la richiesta di glucosio ematico e quindi della gluconeogenesi epatica, e ciò favorisce anche una riduzione della degradazione delle proteine muscolari che altrimenti avrebbero una riduzione eccessiva.

L'ammoniaca liberata dagli aminoacidi è inizialmente convertita in urea nel fegato, successivamente è utilizzata dai reni soprattutto per tamponare l'acidità del sangue, causata dai corpi chetonici. Per questo, in questa 4^a fase, la gluconeogenesi renale ha un'attività maggiore che nella 3^a fase. La gluconeogenesi epatica utilizza prevalentemente alanina e, quella renale, glutamina. Il digiuno può durare oltre 24 giorni con le stesse attività metaboliche della 4^a fase: stabilità di C_{ss} del glucosio, incremento dei corpi chetonici nel sangue, e circa stessi valori di attività di gluconeogenesi. Se non c'è rialimentazione si ha la morte dell'individuo, spesso per polmonite. La polmonite è attribuita ad una minore consistenza dei muscoli intercostali e del diaframma (si assume da catabolismo proteico), con conseguente ridotta rimozione dei fluidi dai bronchioli, che causa una maggiore predisposizione alle infezioni anche in relazione ad una ridotta produzione di anticorpi conseguente anch'essa il lungo digiuno.

Sommario del metabolismo nel digiuno.

La glicemia si mantiene su livelli relativamente alti anche dopo lunghi periodi di digiuno. Ciò è realizzato mediante vari cambiamenti nel tempo dell'attività metabolica dei tessuti:

1^a fase (3-4h)-riduzione di utilizzazione del glucosio da parte dei tessuti; glicogenolisi epatica attivata da effettori.

2^a-3^a fase (1-3 giorni)-gluconeogenesi epatica ed in minor quantità renale e chetogenesi epatica; utilizzazione degli acidi grassi e corpi chetonici da parte dei tessuti.

4^a fase (4-24 giorni)-riduzione della gluconeogenesi epatica, incremento della gluconeogenesi renale, incremento della sintesi dei corpi chetonici. I tessuti extra epatici utilizzano prevalentemente acidi grassi e corpi chetonici. Il tessuto nervoso utilizza corpi chetonici (70%) e glucosio (30%).

c) Condizioni di stress. In queste condizioni vengono liberate catecolamine.

Adrenalina è liberata soprattutto in stato di stress aggressivo (stati in cui si deve agire): sport competitivo, guida di auto nel traffico, sostenere un esame, insegnare a chi non vuole imparare. Nor-adrenalina è liberata in stati di stress ansioso (stati in cui prevale lo stato passivo): interventi dal dentista, volo su aerei, guardare la TV, paracadutismo.

Un'altra interpretazione dei dati sperimentali propone che l'adrenalina sia liberata in situazioni in cui non si sa cosa ci aspetta e la nor-adrenalina in situazioni che abbiamo già sperimentato.

Le catecolamine provocano una iperglicemia per preparare l'organismo all'azione, stimolando la glicogenolisi nel fegato contemporaneamente inibiscono il rilascio dell'insulina per evitare che questa limiti il loro effetto e stimolano la secrezione del glucagone che coopera con esse nella glicogenolisi epatica. Le catecolamine inibiscono l'entrata del glucosio nel muscolo. Ciò può apparire contraddittorio, tuttavia il glucosio ha un effetto inibitorio sulla glicogenolisi e quindi un'alta concentrazione di glucosio nelle fibre muscolari potrebbe essere controproducente, soprattutto per la funzione preparatoria alla contrazione che hanno le catecolamine (vedere dopo). Inoltre, nei primi minuti tutte le contrazioni muscolari sono anaerobiche ed utilizzano la riserva di glicogeno della stessa fibra che si contrae, perchè per via ematica il glucosio ed O₂ non sono forniti con sufficiente velocità (fig. 7-22).

Le catecolamine stimolano la degradazione dei trigliceridi nel T. adiposo, e ciò causa un incremento della C_{ss}-Acidi grassi nel sangue, in parallelo all'incremento delle C_{ss}-glucosio.

Le catecolamine stimolano la degradazione del glicogeno delle fibre muscolari scheletriche per prepararle ad una possibile contrazione. Se allo stato di stress fa seguito la contrazione dei muscoli, come ad esempio nell'attività sportiva, o per fuggire da qualcosa, per difendersi, il

glucosio ed acidi grassi verranno utilizzati per produrre energia. Se invece lo stato di stress non è seguito da attività muscolari (come accade spesso negli stati di stress della vita moderna, es.:sostenere un esame), gli acidi grassi sono riesterificati nel fegato e si ha un incremento dei trigliceridi nel sangue che rimane presente anche dopo un'ora dalla rimozione della causa di stress.

E' stato ipotizzato che l'aumento frequente di trigliceridi nel sangue in persone obese o di debole costituzione, dopo molti anni può causare atero-sclerosi (deposizione di lipidi all'interno del vaso associata a proliferazione di cellule del connettivo fibroso).

Le catecolamine stimolano la forza e la frequenza delle contrazioni del cuore che continua ad utilizzare gli stessi metaboliti portati dal sangue, ora più abbondanti per l'azione delle catecolamine sul fegato e tessuto adiposo. Non è riportata un'azione diretta delle catecolamine sul glicogeno cardiaco.

Il glicogeno cardiaco viene utilizzato quando i battiti cardiaci sono 180 al minuto ed oltre. In queste condizioni il glicogeno è utilizzato per produrre extra ATP anche via glicolisi anaerobia.

Le condizioni di un organismo che stia compiendo od abbia compiuto uno sforzo muscolare prolungato, hanno alcuni aspetti comuni al digiuno ed allo stato di stress. Si ha abbassamento della glicemia e della C_{ss}-insulina ed incremento nel sangue delle C_{ss}-Acidi grassi, catecolamine e glucagone ma non dei corpi chetonici. La formazione dei corpi chetonici è scarsa perchè grandi quantità di acidi grassi sono utilizzati per produrre ATP nelle fibre muscolari che si contraggono. La gluconeogenesi epatica utilizza prevalentemente acido lattico ed alanina provenienti dal tessuto muscolare che si contrae, e glicerolo proveniente dal tessuto adiposo.

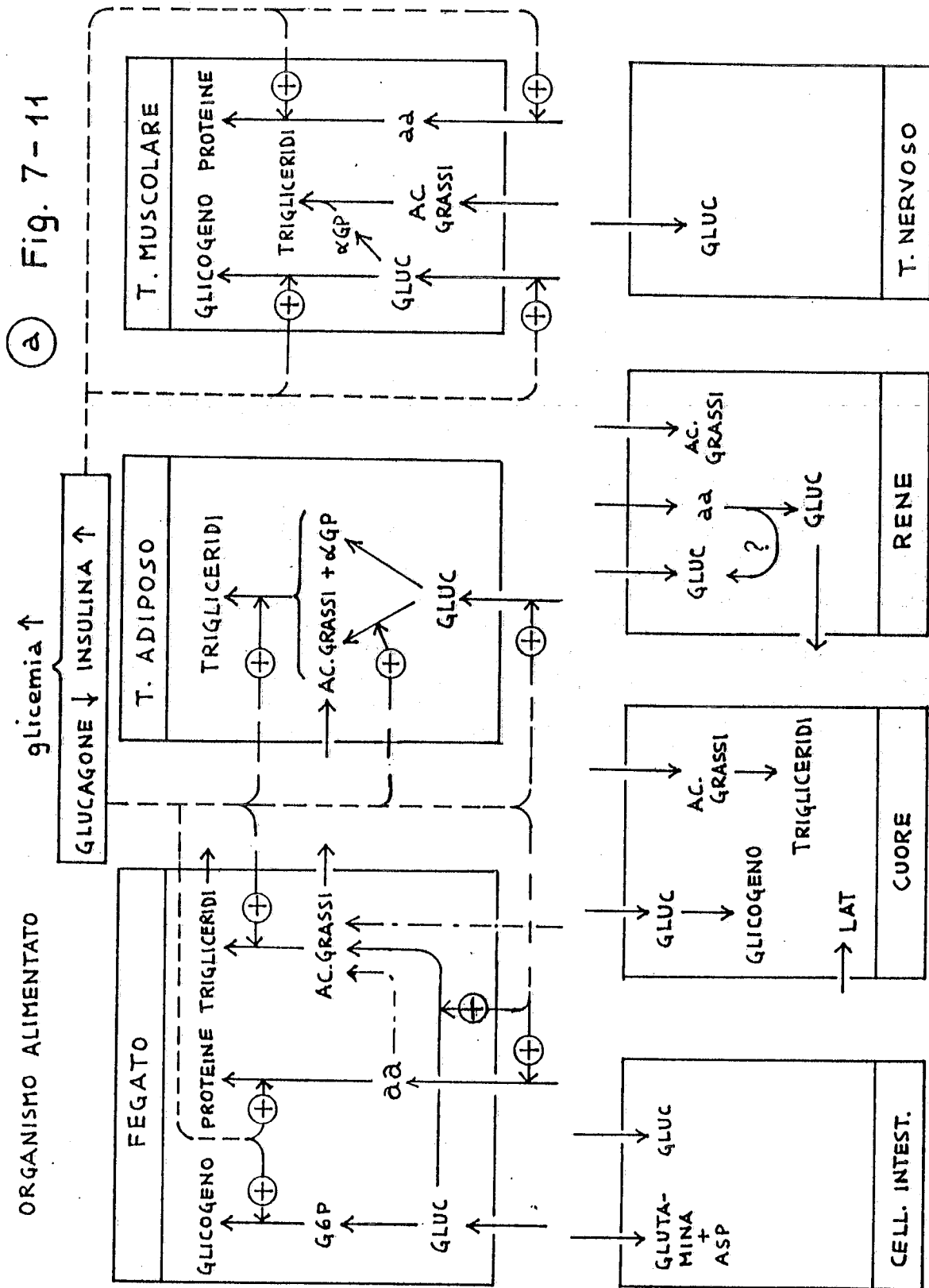
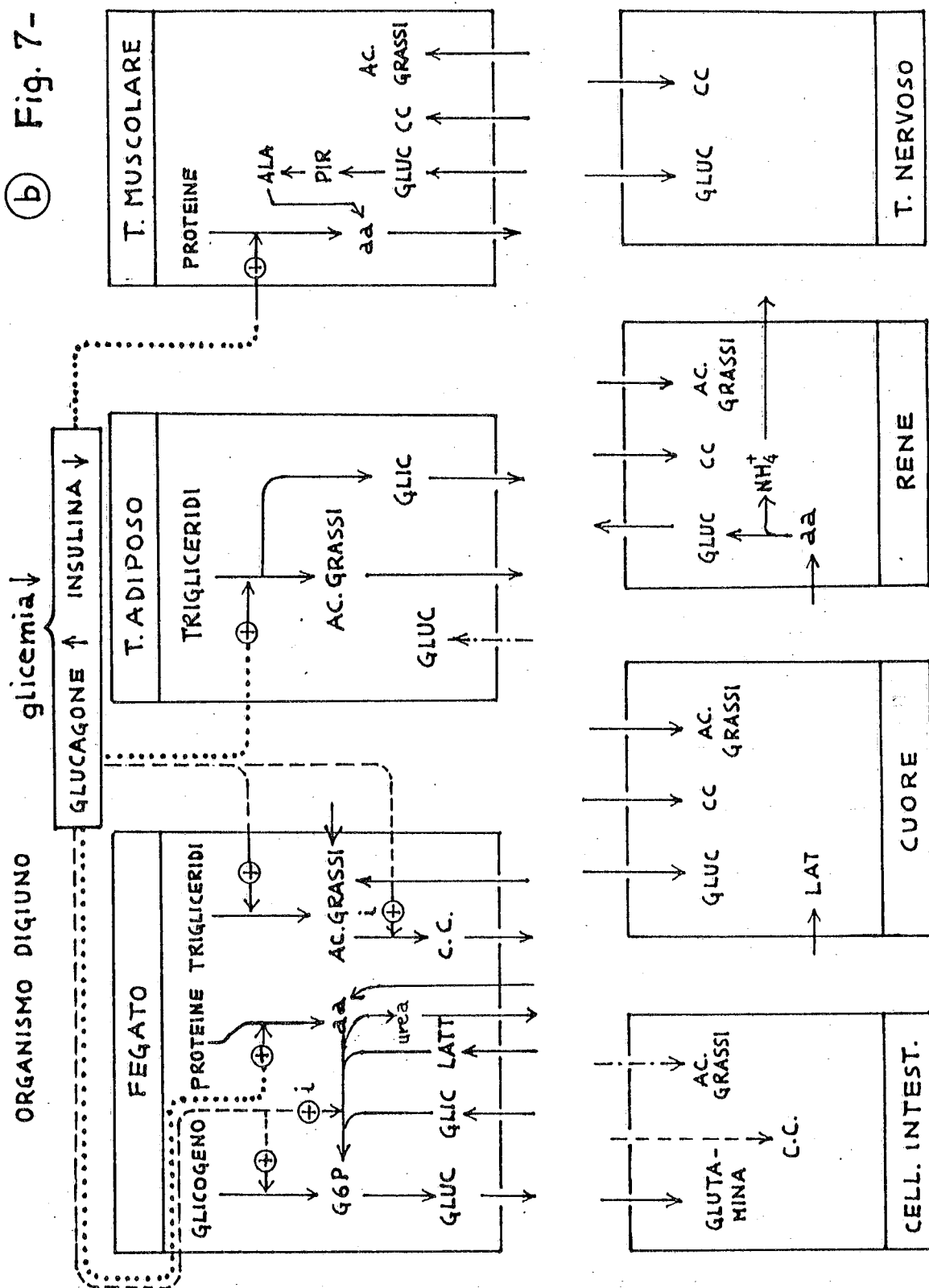


Fig. 7-11



STRESS

(C)

CATECOLAMINE

⊕ → SECREZ. GLUCAGONE
⊖ → SECREZ. INSULINA

Fig. 7-11

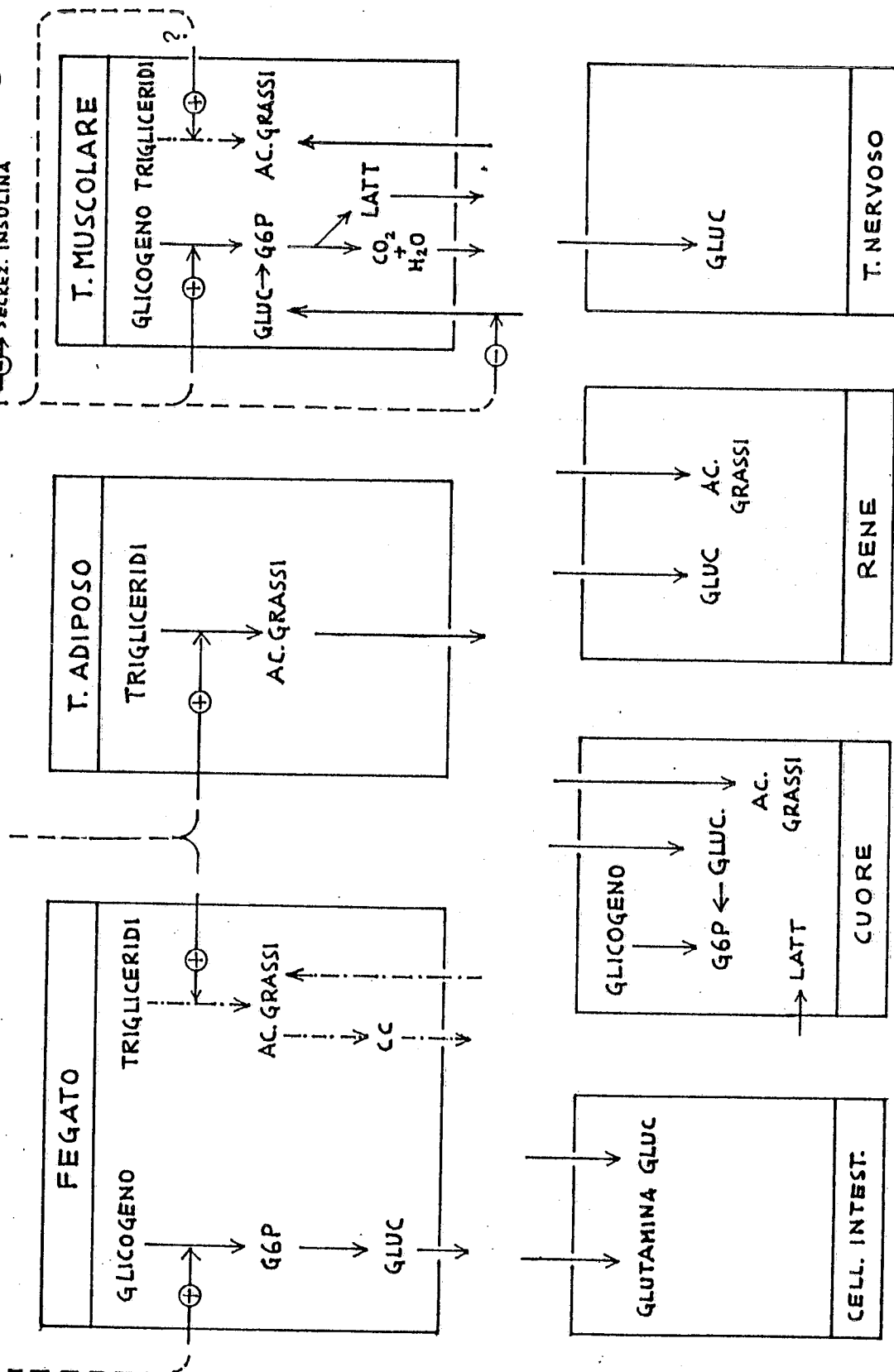


Fig. 7-12

Schema della regolazione ormonale (insulina) del sistema glicolisi-ciclo di Krebs-fosforilazione ossidativa delle vie metaboliche da esso emergenti, nel fegato di mammifero (uomo) alimentato con carboidrati, lipidi, proteine.

La regolazione da effettore (figg. 7-1+7-7) non è indicata per rendere lo schema più semplice. La freccia nel cui interno è scritto il nome dell'enzima indica che l'enzima è nella forma attiva; il rettangolo indica la forma poco o non attiva. La circonferenza indica l'unico insieme (pool) di un composto che, per comodità di segno, compare in più punti dello schema.

Un pasto contenente glucidi fa aumentare la glicemia, da circa 4 mM glucosio nell'uomo digiuno da un giorno, a circa 5 mM glucosio. Nella vena portale epatica che irrorava il fegato, passa da 4 mM glucosio a 10-12 mM.

Il glucosio viene utilizzato in tutte le cellule dell'organismo in relazione all'utilizzazione di ATP in quel momento, cioè in relazione al valore della C_{ss} -ATP.

Due tipi di cellule: epatociti e cellule β del pancreas contengono glucocinasi e quindi utilizzano glucosio in relazione diretta ai valori della glicemia. Nelle cellule β del pancreas, l'incremento della glicemia oltre 5 mM causa un proporzionale incremento della glicolisi che fa aumentare la C_{ss} -PEP, che a sua volta, con un meccanismo ignoto, fa aumentare la C_{ss} - Ca^{2+} . L'incremento di C_{ss} - Ca^{2+} , via la calmodulina, causa una contrazione dei microtubuli che determina il rilascio (exocitosi) dei granuli di insulina nel sistema circolatorio (secrezione). La curva del % di secrezione dell'insulina in relazione alla glicemia è sigmoide.

Con una concentrazione di glucosio 5 mM la secrezione di insulina è molto scarsa, con glucosio circa 8 mM la risposta è il 50%. Il rilascio di insulina è anche stimolato dalla presenza di aminoacidi, acidi grassi, corpi chetonici, ma solo se è presente glucosio.

Nell'epatocita, l'incremento della glicemia causa un incremento della glicolisi oltre le necessità energetiche del momento, e la conversione del glucosio in acidi grassi e trigliceridi (neolipogenesi). Questa condizione metabolica è anche regolata da effettori ed è descritta nella figura 7-3, quando l'organismo è alimentato con soli carboidrati, e nella figura 7-7 quando l'organismo è alimentato con carboidrati, aminoacidi e lipidi. Nella cellula epatica il metabolismo, oltre che da effettori, è regolato da ormoni. Il meccanismo di regolazione ormonale è gerarchicamente più elevato di quello da effettore, perchè la regolazione ormonale regola le vie metaboliche agendo sugli enzimi regolati da effettore, e può operare in opposizione all'azione degli effettori o indipendentemente da questi, inoltre agisce anche su enzimi non regolati facendo variare le C_{ss} dei loro substrati. Un incremento della glicemia porta ad una maggiore C_{ss} -insulina nel sangue, l'ormone per azione di massa si lega con alta affinità e specificità ai recettori plasmatici degli epatociti, causando dei cambiamenti nell'attività di molti

enzimi (effetto pleiotropico) che risulta in un incremento di tutte le sintesi cellulari. L'insulina inoltre incrementa il trasporto degli aminoacidi nell'epatocita, ma non quello del glucosio. Si assume che il mancato stimolo dell'insulina sul trasporto del glucosio nell'epatocita (mentre l'ormone stimola il trasporto del glucosio nelle fibre muscolari e negli adipociti) sia in relazione al fatto che il fegato, organo regolatore della glicemia, debba assumere il glucosio in eccesso ed in dipendenza temporale rispetto agli altri tessuti.

L'insulina attiva la proteina fosfatasi-1, la PDH-fosfatasi, e si assume che l'ormone agisca attivando altre proteina fosfatasi e che causi una riduzione della C_{ss}-AMP (fig. 7-9). In questo modo l'insulina antagonizza gli effetti del glucagone che ha sugli stessi enzimi effetti opposti a quelli esercitati dall'insulina. Inoltre la concentrazione del glucagone nel sangue decresce quando quella dell'insulina sale (figg. 7-9, 7-11, 7-13).

L'insulina stimola le sintesi e simultaneamente inibisce gli enzimi degradativi del composto quando ciò dà luogo ad un ciclo di substrati. Queste sintesi includono la sintesi del glicogeno, del F₁,6diP e dei trigliceridi. Inoltre l'insulina stimola la sintesi degli acidi grassi, del colesterolo e delle proteine.

L'insulina stimola la sintesi proteica stimolando la traduzione degli mRNA e questo effetto è aspecifico, cioè su tutti gli mRNA indipendentemente dalla specie molecolare del mRNA. L'insulina ha anche un effetto specifico sulla sintesi della glucocinasi, che causa un incremento della concentrazione dell'enzima negli epatociti. L'insulina stimola l'attività della fosfofruttocinasi, della piruvato cinasi e della piruvato deidrogenasi, enzimi catabolici che nelle condizioni metaboliche in cui è presente l'insulina (alta glicemia) hanno nell'epatocita funzioni sintetiche, perchè permettono la conversione del glucosio in acetil-CoA e quindi in acidi grassi. La piruvato cinasi del fegato è di tipo L (Liver) ed è regolata da ormoni mediante fosforilazione. La forma M (Muscle) è insensibile agli ormoni.

L'insulina regola le vie metaboliche (sopra indicate) favorendo la conversione degli enzimi e del fattore di iniziazione 2(eIF2) nella loro forma defosforilata che è quella attiva per gli enzimi sintetici (glicogeno sintetasi, piruvato cinasi, piruvato deidrogenasi, Acetil-CoA carbossilasi, α -glicerofosfato-acil-CoA transferasi, 3-idrossi-3-metil-glutaril-CoA reduttasi) e del eIF2. Gli enzimi degradativi nella forma defosforilata sono inattivi o poco attivi (glicogeno fosforilasi-b, lipasi). La FFC e la F₁,6diP-fosfatasi non sono regolate mediante fosforilazione ma mediante l'attivatore allosterico (non metabolico) fruttosio-2,6diP (F₂,6diP).

L'insulina stimolando la sintesi ed inibendo la degradazione del F₂,6diP, fa aumentare la C_{ss}-F₂,6diP e determina l'attivazione della FFC e l'inibizione della F₁,6diP fosfatasi operando così un efficiente controllo del ciclo futile. L'azione del F₂,6diP è potente e rimuove gli effetti inibitori sulla FFC dell'ATP e del citrato.

Nelle condizioni sopra indicate (alimentazione con

carboidrati, lipidi e proteine) si ha la sintesi de novo di P-lipidi, di nucleotidi trifosfati, di RNA (tRNA, rRNA, mRNA). In alcuni tipi di cellula si ha la stimolazione della sintesi del DNA e quindi di replicazione cellulare.

La sintesi del DNA, l'espressione di particolari geni fino alla sintesi delle rispettive proteine e la duplicazione cellulare, pur dipendendo dall'apporto energetico (ATP), sono regolati da meccanismi non necessariamente dipendenti dall'insulina.

L'azione dell'insulina prevale su quella esercitata dagli effettori allosterici in almeno due modi:

1) la forma attiva o più attiva dell'enzima, la cui formazione per defosforilazione è stimolata dall'insulina, è anche insensibile agli effettori allosterici. Questo è il caso della glicogeno sintetasi-a.

2) la sintesi di un effettore la cui C_{ss} è controllata dall'ormone e non dalla C_{ss} del prodotto della via metabolica. L'effettore è potente e limita l'azione di effettori allosterici (metaboliti). Questo è il caso della FFC e del F_{2,6}diP.

Il livello e la durata nel tempo di un alto livello di glicemia, determinano la quantità del rilascio dell'insulina, ed in relazione a questo si ha la durata e l'entità dell'azione dell'insulina sull'epatocita.

Quindi in relazione all'entità d'azione dell'insulina varieranno le quantità relative delle due forme (fosforilata e defosforilata) degli enzimi e del eIF2 e di conseguenza l'attività delle vie metaboliche sarà parzialmente regolata da ormone ed in parte da effettore.

I collegamenti tra i due meccanismi di regolazione sono:

a) L'inibizione operata dal glucosio sulla degradazione del glicogeno. Il glucosio favorisce la formazione della glicogeno fosforilasi-b, favorendone la defosforilazione della forma a (fig. 7-9). Questo effetto è in accordo con quello dell'insulina, tuttavia sembra predisposto per dare risposte pronte a variazioni di glicemia nella vena porta epatica.

b) L'effetto di attivazione sulla PDH del piruvato e dell'insulina e gli effetti inibitori di ATP, NADH ed Acetil-CoA sullo stesso enzima. La necessità di una attivazione della PDH da insulina è spiegata considerando che, in condizione di iperglicemia e di iperlipemia, l'azione di attivazione del piruvato sulla PDH sarebbe insufficiente anche per la relativamente alta C_{ss} del NADH. La C_{ss}-ATP e C_{ss}-Acetil-CoA hanno la funzione di regolare la PDH con la neosintesi degli acidi grassi e trigliceridi. Ambedue ATP ed Acetil-CoA sono substrati della neolipogenesi e le variazioni delle loro C_{ss} sono efficaci segnali per regolare opportunamente la PDH. Quando la neolipogenesi procede, le C_{ss}-ATP e C_{ss}-Acetil-CoA decrescono riducendo così il loro effetto inibitorio sulle PDH. La C_{ss}-NADH invece deve rimanere relativamente alta per inibire parzialmente l>IDH e favorire l'accumulo e quindi l'esportazione dal mitocondrio del citrato al fine di alimentare la neosintesi di acidi grassi.

c) L'effetto di attivazione del F_{1,6}diP e quello di inibizione dell'ATP e dell'Acetil-CoA, alanina e sulla PC nella forma defosforilata, cioè quella attivata da insulina.

L'attivazione da Fl,6diP è in accordo con l'azione dell'insulina, mentre gli altri tre effettori si oppongono all'azione dell'ormone. Questi tre effetti inibitori segnalano una riduzione di tutte le sintesi e quindi tendono a ridurre la glicolisi. In particolare l'eccesso di ATP segnala la riduzione della utilizzazione di ATP e quindi di tutti i processi sintetici, mentre l'eccesso di alanina indica un rallentamento della sintesi proteica, e quello dell'Acetil-CoA della sintesi degli acidi grassi e del colesterolo.

d) L'inibizione del IDH da NADH favorisce l'accumulo di citrato e consente l'esportazione dal mitocondrio di questo metabolita, precursore della sintesi di acidi grassi da glucosio. L'IDH è l'unico enzima (vedi figura) che risulta (per ora) non regolato da insulina, la cui regolazione da effettore (bassa C_{ss}-ADP e/o alta C_{ss}-NADH), corrispondente ad una relativamente scarsa attività catalitica, appare necessaria per la sintesi degli acidi grassi, trigliceridi e colesterolo (figg. 7-2, 7-3), sintesi stimulate dall'insulina per attivazione di altri enzimi appartenenti alle tre vie sintetiche.

Se un individuo si alimenta con diete ricche di carboidrati, rimane sotto influenza di alti livelli di insulina per tempi lunghi durante e dopo i pasti.

Ciò causerà un incremento del patrimonio enzimatico atto a rimuovere rapidamente il glucosio nel sangue ed a trasformarlo in altri composti. Un esempio è la stimolazione della sintesi della glucocinasi da parte dell'insulina.

Più lunga nel tempo sarà l'esposizione all'insulina dell'epatocita, maggiore sarà la sintesi della glucocinasi. In questo modo, la cellula epatica aumenta la sua capacità a metabolizzare il glucosio e quindi è meglio predisposta per il pasto successivo ricco di carboidrati (sempre che l'individuo non cambi abitudine e cominci a mangiare bistecche e/o riduca le calorie della dieta). Inoltre l'eccesso di substrato protegge gli enzimi dalle azioni delle proteasi e ciò risulta in un incremento delle C_{ss} degli enzimi.

Se l'alimentazione è esclusivamente di carboidrati, l'insulina è ugualmente rilasciata nel sangue e può stimolare la sintesi del glicogeno, trigliceridi, colesterolo, mentre la sintesi proteica, sebbene sia stimolata, è limitata dal mancato apporto di aminoacidi.

Se l'alimentazione è priva di carboidrati (solo proteine e lipidi) non si ha incremento della glicemia e quindi non si ha rilascio di insulina. In questo caso il metabolismo dei carboidrati nel fegato è simile a quello del digiuno (fig. 7-13). Mentre la sintesi delle proteine e dei trigliceridi procede, gli acidi grassi sono ossidati per produrre energia.

Fig. 7-12

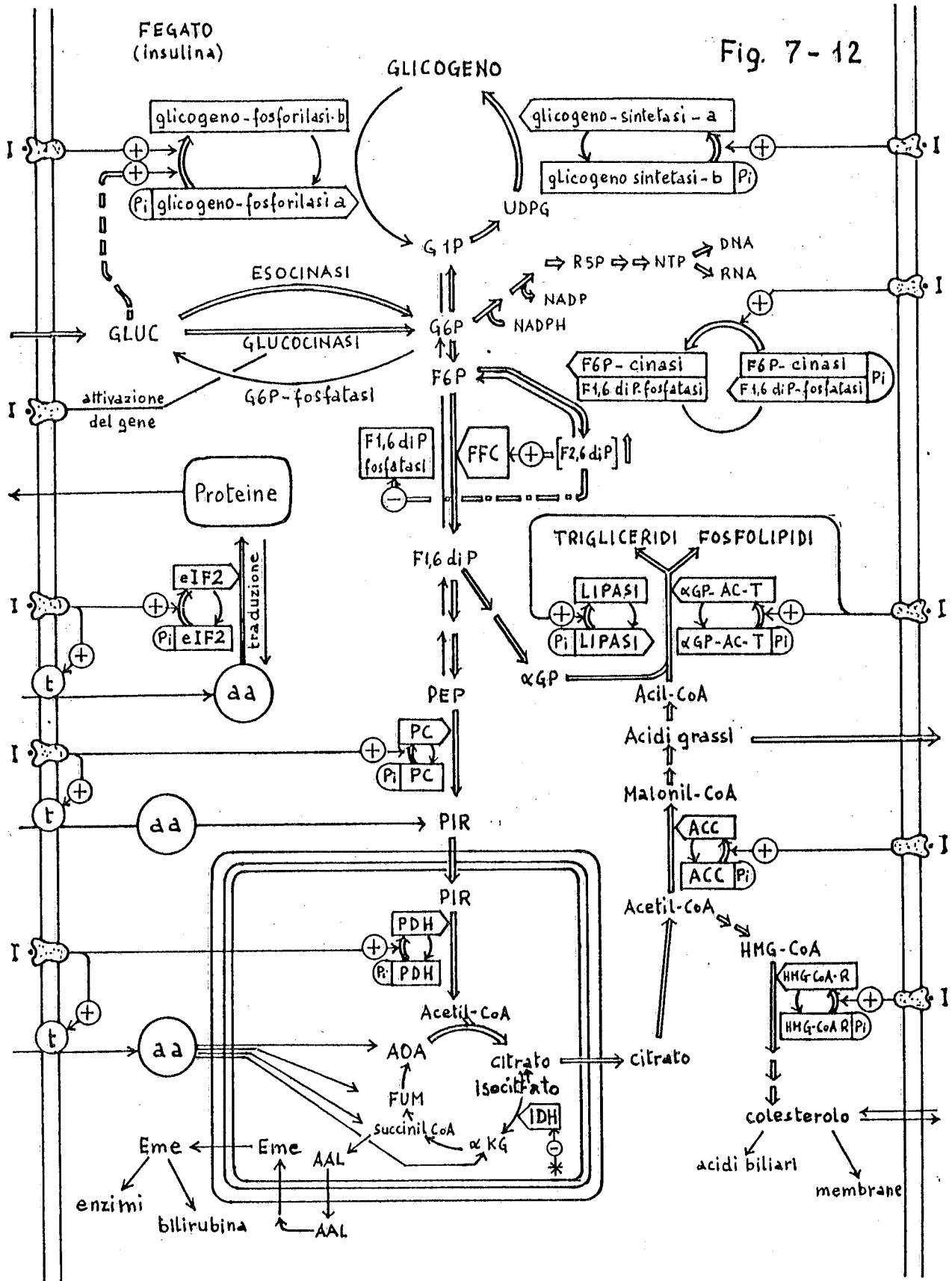


Fig. 7-13

Schema della regolazione ormonale (glucagone) del sistema glicolisi-ciclo di Krebs-fosforilazione ossidativa, della gluconeogenesi e delle vie su esso convergenti nel fegato di mammifero (uomo) digiuno.

Con * è indicata la regolazione da effettori determinante per l'avvenire della gluconeogenesi, per altri dati sulla regolazione da effettori vedere figg. 7-1, 7-2, 7-8, e per la regolazione ormonale figg. 7-9+7-11.

In condizioni di digiuno la glicemia scende da 5,5 mM glucosio (uomo alimentato) a 4,4 mM glucosio dopo 1 giorno, ed a 3,8 mM glucosio dopo 3 giorni. Dopo 7 giorni di digiuno la glicemia è 3,6 mM glucosio e questo valore rimane costante fino a 28-42 giorni di digiuno.

Il primo decremento della glicemia è il segnale che attiva la regolazione del metabolismo atto ad opporsi al decremento stesso della glicemia. Infatti la glicemia ha un forte decremento nei primi tre giorni di digiuno (circa 31%), tuttavia nei giorni successivi rimane pressochè costante (cala del 5%). Ciò è realizzato mediante un cambiamento nel metabolismo di tutti i tessuti operato dalla regolazione ormonale mediante incremento della C_{ss}-glucagone e decremento della C_{ss}-insulina nel sangue.

In condizioni di digiuno, tutti i tessuti, per risparmiare glucosio, si adattano ad utilizzare una maggiore quantità di acidi grassi e/o corpi chetonici per produrre ATP mentre il fegato sintetizza corpi chetonici da acidi grassi e glucosio da aminoacidi (leggere anche didascalia della fig. 7-11).

In tutti i tessuti prevalgono le vie degradative, inclusa la proteolisi. La proteolisi interessa (almeno nelle prime fasi di digiuno) le proteine non o meno utilizzate, perchè non protette contro l'azione della proteasi dalla presenza dei rispettivi substrati, mentre le proteine utili nelle condizioni di digiuno sono sintetizzate. Ad esempio gli enzimi gluconeogenetici, PEP-CO₂-cinasi e Piruvato carbossilasi, aumentano in concentrazione nel fegato in condizioni di digiuno, non solo per ridotta degradazione ma anche per neosintesi. Tutti questi adattamenti, anche se di minore entità, si verificano quotidianamente nell'intervallo tra un pasto e l'altro (se l'intervallo supera le 3-4 h e se il pasto precedente non è stato molto abbondante di lipidi e proteine che riducono la velocità di svuotamento gastrico). Gli adattamenti sono di maggiore entità nel digiuno durante il riposo notturno, che è di circa 10 h.

L'abbassamento della glicemia provoca automaticamente la secrezione del glucagone dalle cellule α del pancreas endocrino e la riduzione nella secrezione di insulina e quindi la riduzione della sua C_{ss} nel sangue. L'insulina presente, viene inattivata per endocitosi del complesso ormone-recettore (fig. 7-9 f). L'insulina nel plasma ha un tempo di mezza vita di 3-5 min. Anche il glucagone viene continuamente inattivato dal fegato e rene, ed ha un tempo di mezza vita di 6-7 min. In condizioni di ipoglicemia i valori relativi della velocità di secrezione e di inattivazione dei due ormoni sono tali che la C_{ss}-glucagone nel sangue sale, mentre la C_{ss}-insulina decresce.

In condizioni in cui la glicemia sale si hanno effetti opposti sulle Css dei due ormoni, perchè lo stimolo alla secrezione del glucagone è l'ipoglicemia, e per l'insulina l'iperglicemia.

Il glucagone agisce su tutti gli enzimi regolati da effettore su cui agisce l'insulina (eccetto la PDH), esercitando su essi effetti di segno opposto a quelli esercitati dall'insulina (fig. 7-12).

Il glucagone agisce mediante gli enzimi proteina-cinasi cAMP dipendenti (fig. 7-9) favorendo la fosforilazione degli enzimi e del eIF2 che sono regolati con questo meccanismo.

La PDH è regolata mediante fosforilazione catalizzata da una cinasi non dipendente da cAMP, e quindi è insensibile all'azione diretta del glucagone (fig. 7-9). La PDH-cinasi è regolata da effettori (vedere * in questa figura).

La forma fosforilata degli enzimi degradativi è attiva (glicogeno fosforilasi-a, lipasi) mentre la forma fosforilata degli enzimi sintetici (glicogeno sintetasi-b, Acetil-CoA carbossilasi, α GP-Acil-CoA transferasi, idrossimetil-glutaril-CoA carbossilasi) e del eIF₂ è poco o non attiva. Con lo stesso meccanismo molecolare il glucagone inibisce la PC e la FFC, enzimi della glicolisi.

Per azione del glucagone la PC epatica (isoenzima L) viene convertita nella forma fosforilata (poco o non attiva ed insensibile agli effettori), la FFC non è attivata dal F₂,6diP e la F₁,6diP-fosfatasi non è inibita perchè il glucagone causa una riduzione delle Css-F₂,6diP (fig. 7-9). Gli effetti sopra indicati causano una attiva glicogenolisi e gluconeogenesi, lipolisi, β -ossidazione e chetogenesi, mentre sono inibite le sintesi del glicogeno, degli acidi grassi, dei trigliceridi e del colesterolo, e la sintesi delle proteine a livello della traduzione. Gli effetti sulle vie metaboliche sono diretti, eccetto che per la β -ossidazione e chetogenesi che sono attivate dai rispettivi substrati, la Css dei quali è incrementata nel fegato per azione del glucagone.

Il glucosio-6P sintetizzato viene defosforilato a glucosio ed esportato per mantenere la glicemia nei valori fisiologici. E' improbabile che il G6P prenda la via glicolitica, data l'inibizione della FFC (vedere sopra e dopo). La sintesi di G6P da glucosio è scarsa, dato che, stante la bassa glicemia, la glucocinasi è poco attiva e l'esocinasi subisce l'inibizione del G6P. Il ciclo di substrati (glucosio-G6P) è scarsamente attivo e risulta regolato verso la sintesi netta di glucosio. La regolazione del ciclo è da substrato: il G6P è prodotto per via gluconeogenetica e glicogenolitica, ed il glucosio eliminato per esportazione dalla cellula in conseguenza della bassa glicemia.

L'attivazione della lipolisi nel fegato causa un incremento della Css-Acil-CoA citoplasmatica, poi di quella mitocondriale, che a sua volta farà aumentare la β -ossidazione. Gli Acetil-CoA prodotti alimenteranno il ciclo di Krebs per la sintesi di ATP e la sintesi dei corpi chetonici; questi ultimi sono esportati dall'epatocita. La sintesi dei corpi chetonici è innescata dall'alta Css-NADH nel mitocondrio che causa l'incremento della Css-citrato, e questo l'inibizione della CS. Gli aminoacidi

(gluconeogenetici) sono convertiti in glucosio via la gluconeogenesi.

L'azione del glucagone riducendo la C₅S-F₂,6diP, rende attiva (per disinibizione) la F₁,6diP fosfatasi, mentre non attiva direttamente gli altri enzimi tipici della gluconeogenesi: G6P fosfatasi, PCa e PEPCO₂ cinasi.

Il glucagone favorisce la gluconeogenesi anche inibendo la glicolisi. L'azione diretta del glucagone è sulla PC che viene inibita e la FFC che non viene attivata. L'inibizione della FFC e quella della PDH vengono realizzate per azione di effettori-metaboliti le cui C₅S sono aumentate per azione del glucagone sugli enzimi del metabolismo lipidico (attivazione delle lipasi, inibizione ACC e HMG-CoAR). La FFC è inibita da ATP e citrato, la PDH è convertita nella forma fosforilata (poco o non attiva) per stimolazione della PDH-cinasi da ATP, NADH ed Acetil-CoA. L'unico enzima gluconeogenetico che è attivato, è da effettore (Acetil-CoA) è la PCa (fig. 7-8).

Gli incrementi delle C₅S dell'ATP, citrato, NADH ed Acetil-CoA sono tutti conseguenti alla forte attivazione della degradazione dei trigliceridi epatici da parte del glucagone. Tuttavia questi incrementi non durerebbero a lungo se concomitantemente non ci fosse la liberazione di acidi grassi del tessuto adiposo, che può sostenere per tempi lunghi una attiva β -ossidazione nel fegato, e con la β -ossidazione la gluconeogenesi e la sintesi dei corpi chetonici.

La lipolisi del tessuto adiposo è attivata dalla riduzione della C₅S-insulina nel sangue. In conseguenza di ciò si ha attivazione delle lipasi ed inibizione della sintesi di acidi grassi e di trigliceridi.

La regolazione del metabolismo nel fegato di un organismo digiuno mostra chiaramente l'integrazione delle regolazioni da substrato, da effettore e da ormone.

La regolazione ormonale è responsabile di una efficiente regolazione del metabolismo nel digiuno per la sua forte attivazione della degradazione del glicogeno e dei trigliceridi che si realizzerebbero più lentamente da substrato e con la sola azione degli effettori. Tuttavia senza l'azione degli effettori, PDH e FFC sarebbero più attive causando una maggiore attività glicolitica e quindi una minore sintesi netta di G6P gluconeogenetico. Inoltre la regolazione di effettori è responsabile dell'attivazione dell'enzima gluconeogenetico piruvato carbossilasi.

Nonostante la regolazione del glucagone, la FFC rimane il pace-maker della glicolisi. Anche in condizioni di digiuno, se per qualsiasi motivo la C₅S-ATP si dovesse abbassare, la glicolisi verrebbe riattivata per disinibizione della FFC al fine di formare rapidamente l'ATP richiesto.

L'inibizione della traduzione, per fosforilazione del eIF2, fa sì che la degradazione delle proteine sia quantitativamente maggiore della loro sintesi con conseguente produzione di aminoacidi liberi, che sono utilizzati per la neosintesi del glucosio. La degradazione delle proteine è anche stimolata da glucocorticoidi.

Durante il digiuno notturno si ha anche una drastica riduzione del numero dei ribosomi e degli mRNA. I pentosi degli RNA e gli aminoacidi derivati dalla degradazione delle

proteine, sono utilizzati per formare glucosio. Proteine ed acidi nucleici sono risintetizzati con i pasti durante il giorno, al fine di mantenere costante la concentrazione del glicogeno, lipidi, proteine e acidi nucleici. Non tutte le molecole di una data specie molecolare di mRNA vengono distrutte con il digiuno. Ad esempio, gli mRNA dell'albumina sono degradati in quantità pari all'80%. Il rimanente 20% viene associato a proteine e così reso biologicamente inattivo. Con la rialimentazione le molecole di mRNA vengono dissociate dalle proteine e si legano ai ribosomi per dirigere la sintesi dell'albumina. In questo modo viene attivata più rapidamente la sintesi della proteina e quindi la sua liberazione nel sangue, al fine di ristabilire una [albumina] ematica sufficiente a garantire il trasporto di acidi grassi aumentati in concentrazione nel sangue in seguito all'alimentazione. Le catecolamine esercitano sul fegato gli stessi effetti del glucagone, avendo su questo organo i recettori α_1 e β_2 adrenergici. L'adrenalina è 10 volte più affine ai recettori β_2 della nor-adrenalina, e quindi a parità di concentrazione risulta più attiva. L'adrenalina è secreta in relazione a stati di stress e pur avendo sul fegato la stessa azione del glucagone, svolge una funzione diversa anche in relazione alla sua azione sul tessuto muscolare scheletrico, tessuto adiposo e cuore (fig. 7-11).

Fig. 7-13

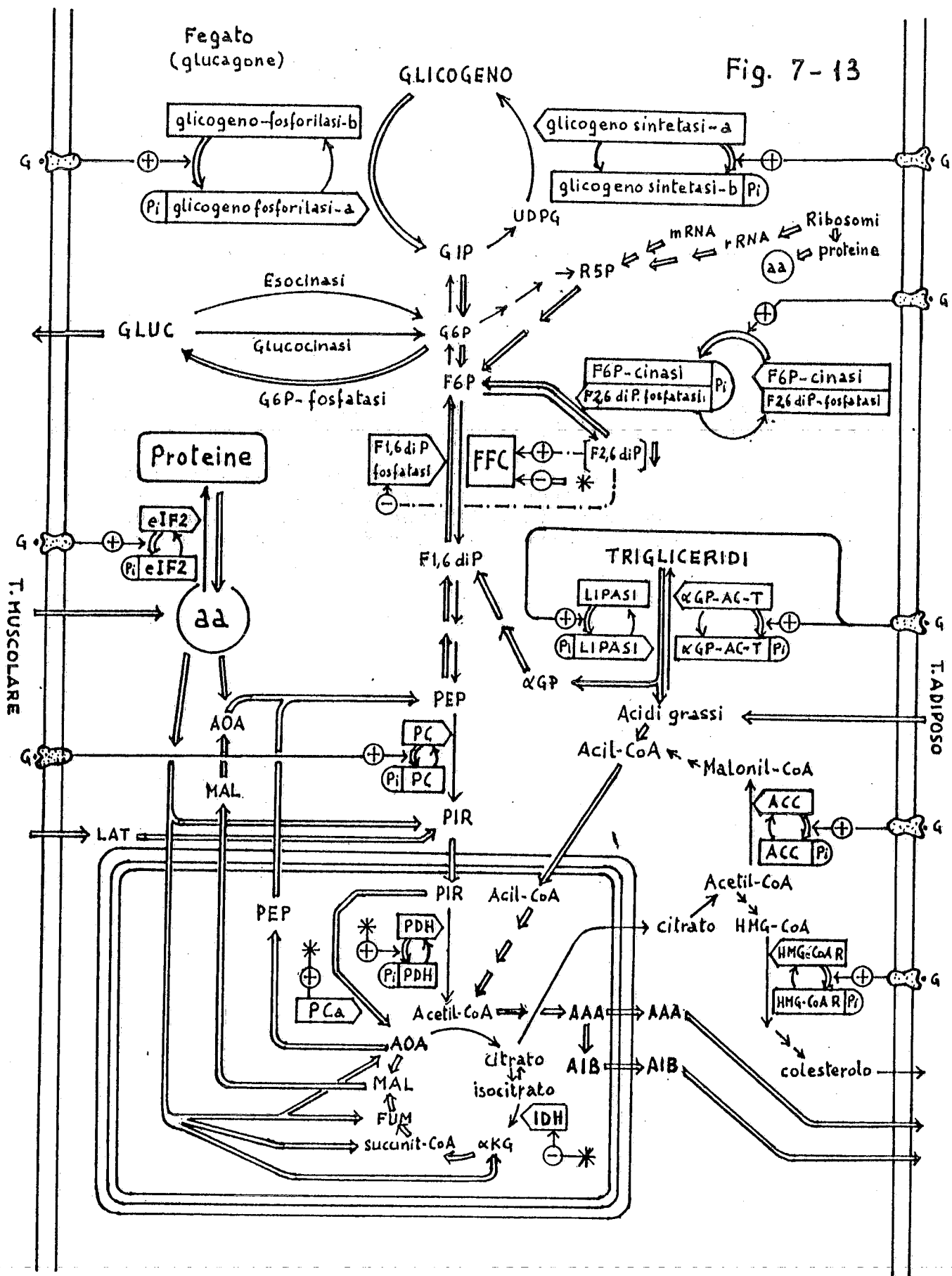


Fig. 7-14

Regolazione della sintesi del colesterolo nel fegato umano.

La sintesi del colesterolo è inibita a livello della idrossi-metil-glutaril-CoA reduttasi (HMG-CoA reduttasi). Il fegato è l'organo che sintetizza la maggior quantità di colesterolo. Le cellule intestinali hanno una attiva sintesi di colesterolo; la sintesi di colesterolo avviene in minore quantità anche in altri tessuti.

L'enzima HMG-CoA reduttasi è controllato con tre differenti meccanismi:

1) da effetto:

-il colesterolo inibisce l'enzima, e così la sua sintesi, con il tipico meccanismo a feed-back. Quindi anche se il colesterolo proviene dalla dieta, un incremento della sua concentrazione inibisce la sintesi de novo. Il significato è di evitare concentrazioni troppo alte del colesterolo nell'epatocita e nel sangue.

-il mevalonato inibisce l'enzima. Si assume che il significato di questa inibizione sia di evitare l'accumulo di intermedi poco solubili (vedere dopo).

-la proteina trasportatrice di steroli (PTS) è inibitore dell'enzima. Si assume che questa inibizione abbia la funzione di evitare l'accumulo nel citoplasma di intermedi poco solubili (trasportati dalla PTS), che se in eccesso potrebbero legarsi a proteine o strutture cellulari influenzandone l'attività. Si assume che l'inibizione dell'enzima sia controllata dalla PTS associata a steroli e non da PTS libera.

2) da ormone:

-la regolazione è via la proteina cinasi, ma è particolare perché la proteina cinasi che fosforila la HMG-CoA reduttasi rendendola inattiva non è cAMP dipendente.

Ma l'inattivazione di questa proteina cinasi è dipendente dall'ormone perché la proteina cinasi cAMP-dipendente fosforila attivandola una proteina inibitrice due enzimi proteina-fosfatasi: HMG-CoA-reduttasi fosfatasi e HMG-CoA-reduttasi-cinasi fosfatasi (vedere anche fig. 7-9). Quindi il glucagone, elevando la Css-cAMP, determina una inibizione della sintesi del colesterolo, mentre l'insulina attiva la sintesi del colesterolo attivando direttamente le fosfatasi suddette e facendo diminuire la Css-cAMP (fig. 7-9).

3) per repressione del gene:

-il colesterolo inibisce la trascrizione del gene dell'enzima HMG-CoA reduttasi causando una riduzione della sintesi dell'enzima. L'enzima diminuirà poi in concentrazione per l'azione continua delle proteasi cellulari.

Fegato
sintesi colesterolo

Fig. 7 - 14

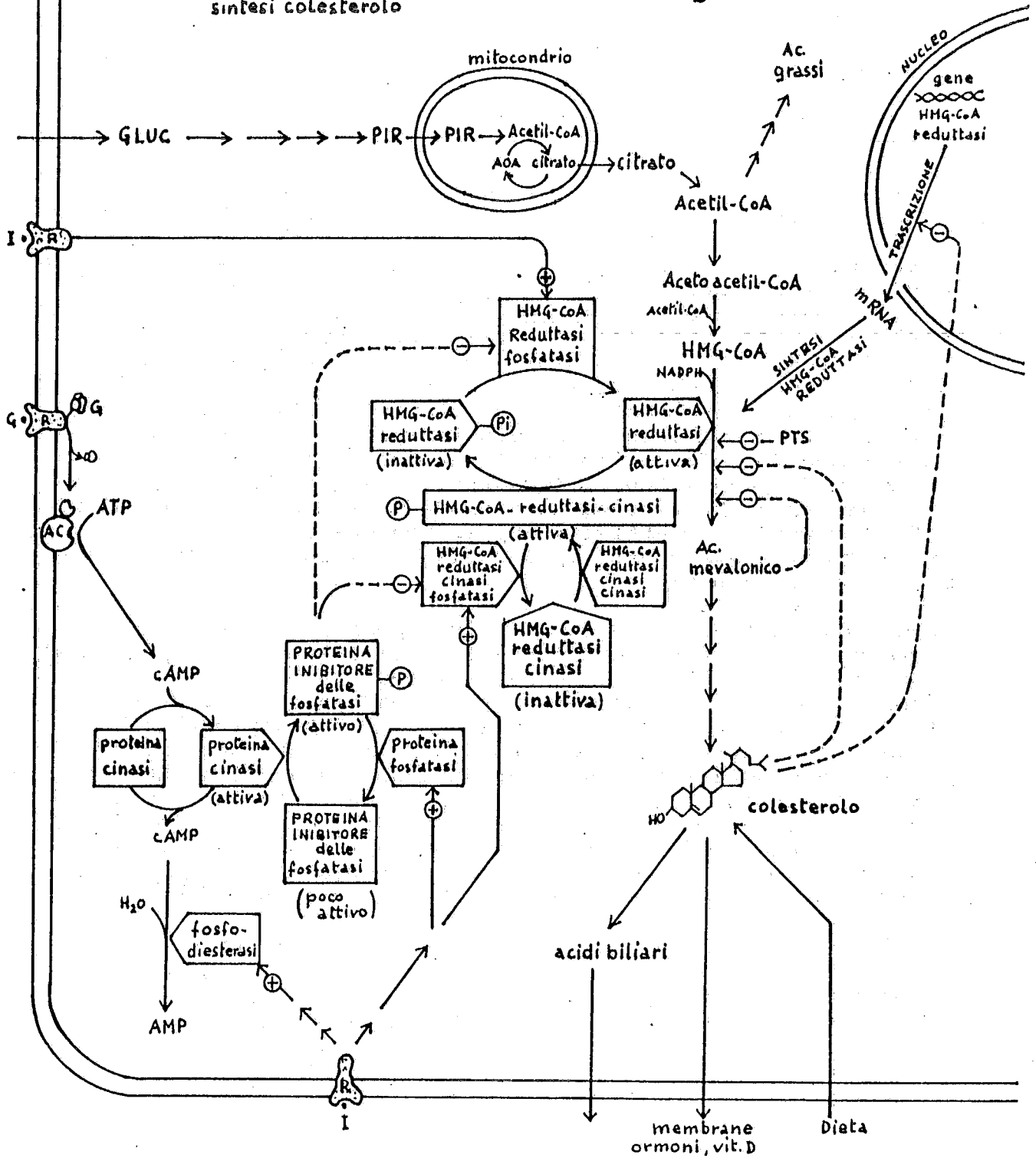


Fig. 7-15

Regolazione della sintesi dell'eme nel fegato di mammifero (uomo).

Esistono almeno tre insieme (pool) di EME libero: mitocondriale, citoplasmatico e microsomiale. Questi pool sono in equilibrio tra loro.

Regolazione dell'acido δ amino-levulinico sintetasi (AAL-sintetasi).

- 1) Regolazione da substrato: glicina. Proposto perchè la K_m per la glicina è alta e la concentrazione mitocondriale della glicina è $1/5 \pm 1/20$ della K_m della AAL-sintetasi. Quindi il meccanismo di trasporto della glicina nel mitocondrio può essere un punto di regolazione.
- 2) Regolazione da effettori: l'EME è effettore negativo.
- 3) Regolazione della sintesi: l'EME è repressore dell'espressione del gene dell'AAL-sintetasi a livello della trascrizione e traduzione. La regolazione può essere molto efficiente perchè l'enzima ha un'alta velocità di turnover con un tempo di mezza vita di 1-3 h.
- 4) Trasporto dell'enzima nel mitocondrio: l'EME è inibitore.

Regolazione dell'AAL-deidratasi: inibita da EME.

Sommario: l'eccesso di EME blocca la sua sintesi allostericamente su due enzimi ed inibisce la sintesi dell'AAL-sintetasi. La AAL-sintetasi ha una alta velocità di degradazione per cui quando la sua sintesi è inibita nel giro di poche ore la sua concentrazione è ridotta a meno della metà.

FEGATO
(EME)

Fig. 7-15

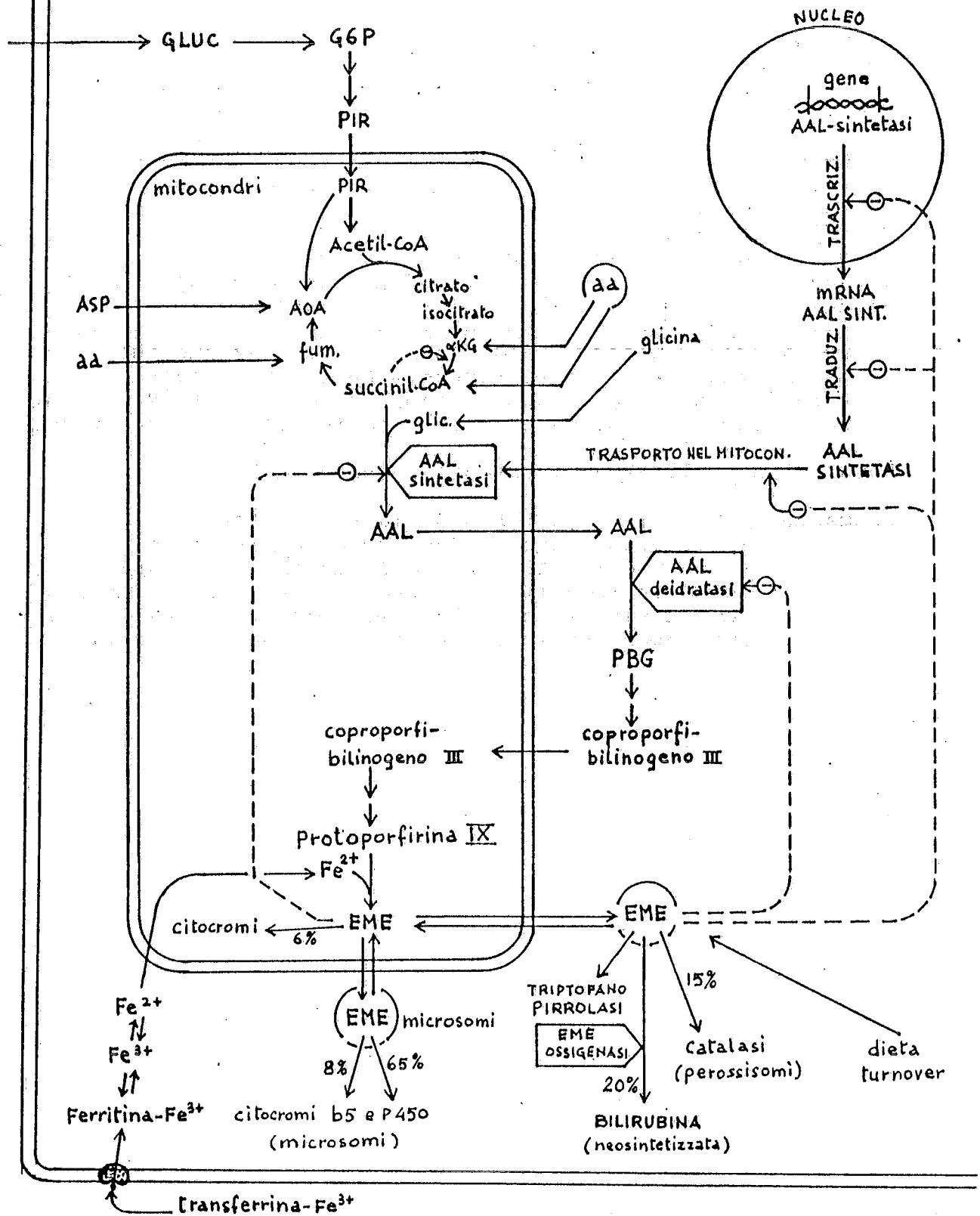


Fig. 7-16

Regolazione della sintesi dei nucleotidi purinici e pirimidinici nel fegato di mammifero (uomo).

Il fegato ha tutto il corredo di enzimi per la sintesi "de novo" dei nucleotidi pirimidinici. I globuli rossi ed altri tipi di cellule hanno gli enzimi per la sintesi del PRPP e per le reazioni successive alla sintesi di IMP al fine di recuperare le basi puriniche e pirimidiniche provenienti dal turnover e dalla dieta.

La sintesi del PRPP è controllata dai prodotti finali (nucleotidi) delle due vie di sintesi, inoltre le due vie di sintesi sono controllate dai rispettivi prodotti finali. La via di sintesi dei nucleotidi purinici è controllata anche a livello delle reazioni di ramificazione, al fine di controllare la velocità di sintesi di ATP e GTP nelle proporzioni richieste dalla cellula (vedere anche fig. 5-6). I nucleotidi purinici controllano la sintesi di quelli pirimidinici via il PRPP. Se la C_{ss}-PRPP aumenta, perchè il PRPP non è utilizzato per la sintesi dei nucleotidi purinici, viene inibita la CAS-II, e quindi anche la sintesi dei nucleotidi pirimidinici.

Il sistema di regolazione, essendo a feed-back, viene messo in funzione anche quando i prodotti finali (nucleotidi) sono sintetizzati mediante le vie di ricupero (o salvataggio), utilizzando basi e nucleosidi provenienti dalla dieta e dalla degradazione di nucleotidi già presenti nella cellula (turnover).

Nell'uomo la via di ricupero delle basi utilizza la reazione Base-PRPP transferasi (3). La reazione è catalizzata da due enzimi diversi, uno specifico per l'adenina e l'altro per guanina ed inosina.

La reazione nucleotide fosforilasi probabilmente è solo degradativa.

La reazione adenosina cinasi è catalizzata da un enzima molto attivo e presente in tutti i tessuti, mentre la inosina cinasi e guanosina cinasi sono presenti nel fegato e assenti nei fibroblasti umani.

La funzione fisiologica dell'inibizione da 2,3diPGA non è nota. Nel globulo rosso il DPG inibisce la RIB5P-difosfotransferasi, tuttavia non se ne conosce il significato.

AD-succ = Adenil-succinato

AD-cinasi = Adenilato cinasi

CAS-II = Carbo-amil-fosfato sintetasi II (CAS-I è mitocondriale, non è regolata e sintetizza carboamil-fosfato per la sintesi dell'urea).

DPG = 2,3diP glicerato

N = Nucleotide

PRPP = 5P-Ribosil 1-pirofosfato.

R = Ribosio

Vie di recupero:

- 1 - Ribosio cinasi
- 2 - R5P cinasi
- 3 - Base-PRPP-transferasi
- 4 - R5P-RIP mutasi
- 5 - Base-Nucleoside fosforilasi
- 6 - Nucleoside cinasi

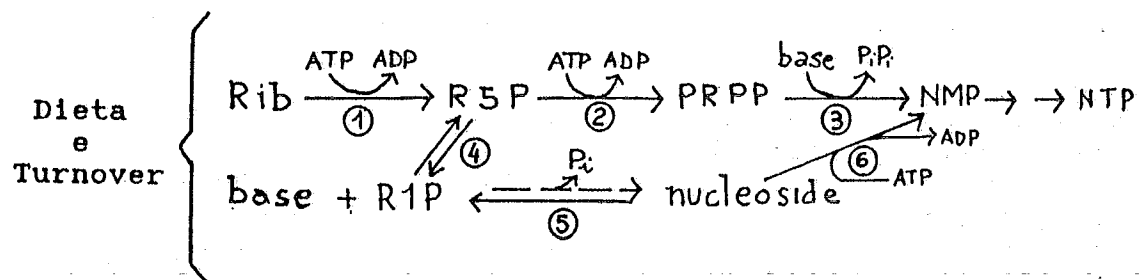


Fig. 7-17

Schema della regolazione della sintesi dei desossiribonucleotidi purinici e pirimidinici nei mammiferi (uomo)

(da Thelander L. e Reichard P., Ann. Rev. Biochem. 48, 133 (1979)).

a)

- 1- dATP inibisce le riduzioni di tutti i NDP (ADP, GDP, CDP, TDP)
- 2- ATP attiva le riduzioni di CDP e UDP (N-pirimidinici)
ATP rimuove le inibizioni da dATP (indicata in figura con punteggiatura....X).
- 3- dTTP inibisce la riduzione di UDP e CDP (N-pirimidinici)
dTTP attiva la riduzione di GDP
- 4- dGTP inibisce la riduzione di UDP, CDP e quella del GDP
dGTP attiva la riduzione di ADP

N = Nucleotide

1 e 2, controllo della sintesi di tutti i nucleotidi; 3 e 4, prevalentemente per l'equilibratura delle quantità dei dNTP al fine di avere i 4NTP in quantità tra loro comparabili e sufficienti a sostenere la sintesi del DNA. L'enzima ribonucleotide reductasi è un'unica specie molecolare ed accetta indistintamente come substrati UDP, CDP, ADP e GDP (in figura per comodità sono state disegnate 4 molecole). Gli effetti di regolazione sulla riduzione di particolari substrati (es. attivazione della riduzione di GDP a dGDP da parte del dTTP) è dovuta al fatto che la molecola di enzima che lega il dTTP viene attivata per ridurre specificamente il GDP e non altri nucleotidi (vedere b).

b)

La regolazione dei desossiribonucleotidi è proposta con uno schema diverso da quello presentato in a).

(1) e (2,3,4) rappresentano i due aspetti funzionali della ribonucleotide reductasi che è un enzima regolato costituito da due diverse subunità, ciascuna composta da due polipeptidi uguali. L'enzima è regolabile in modo da poter variare positivamente o negativamente l'attività catalitica e/o la specificità di substrato. Ciò è realizzato mediante due tipi di regolazione con un solo sito di catalisi per subunità.

I) L'eccesso di dATP inibisce l'enzima qualsiasi sia il substrato con cui forma il complesso (1).

II) ATP è attivatore dell'enzima solo se ha come substrati i nucleotidi pirimidinici (2). Quindi l'ATP conferisce attivazione substrato-specifica.

III) L'eccesso di dTTP inibisce l'enzima (2) quando lega come substrati i nucleotidi piridinici difosfati (UDP e CDP), mentre quando l'enzima (4) lega come substrato il GDP viene attivato, e se lega come substrato il dADP (3) non subisce variazioni. Quindi l'enzima, quando lega il dTTP nel sito di regolazione, assume una specificità di regolazione verso i substrati: se sono pirimidinici è inibito, se è ADP la sua attività non è influenzata, se è GDP è attivato.

IV) Il dGTP inibisce l'enzima che lega UDP e CDP (2) o GDP (4), mentre lo attiva se lega ADP (3).

Lo scopo di questi complessi controlli incrociati è di avere dNTP in quantità equimolari sufficienti a sostenere la sintesi del DNA.

La C_{ss}-ATP ha una funzione di stimolo sulla sintesi dei deossi-nucleotidi pirimidinici ed è capace di rimuovere anche le eventuali inibizioni da dTTP e dGTP. Il dTTP attiva la sintesi dei dGTP, e dGTP quella del dATP. Quindi l'ATP stimola, direttamente o indirettamente, la formazione di tutti i dNTP, e le condizioni energetiche ottimali (alti valori di C_{ss}-ATP nella cellula) favoriscono la replicazione del DNA.

Fig. 7-17 (a)

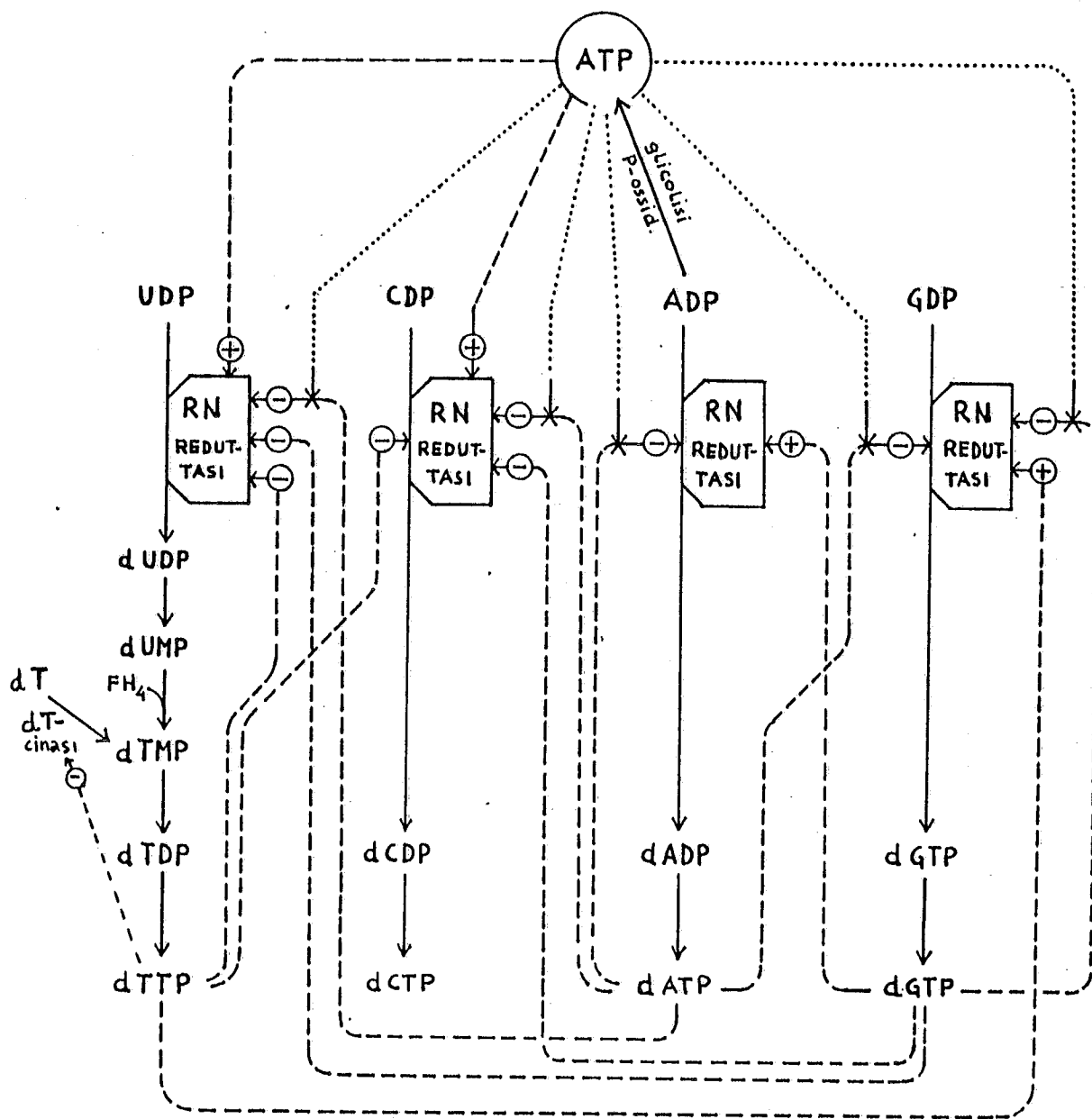


Fig. 7-17 (b)

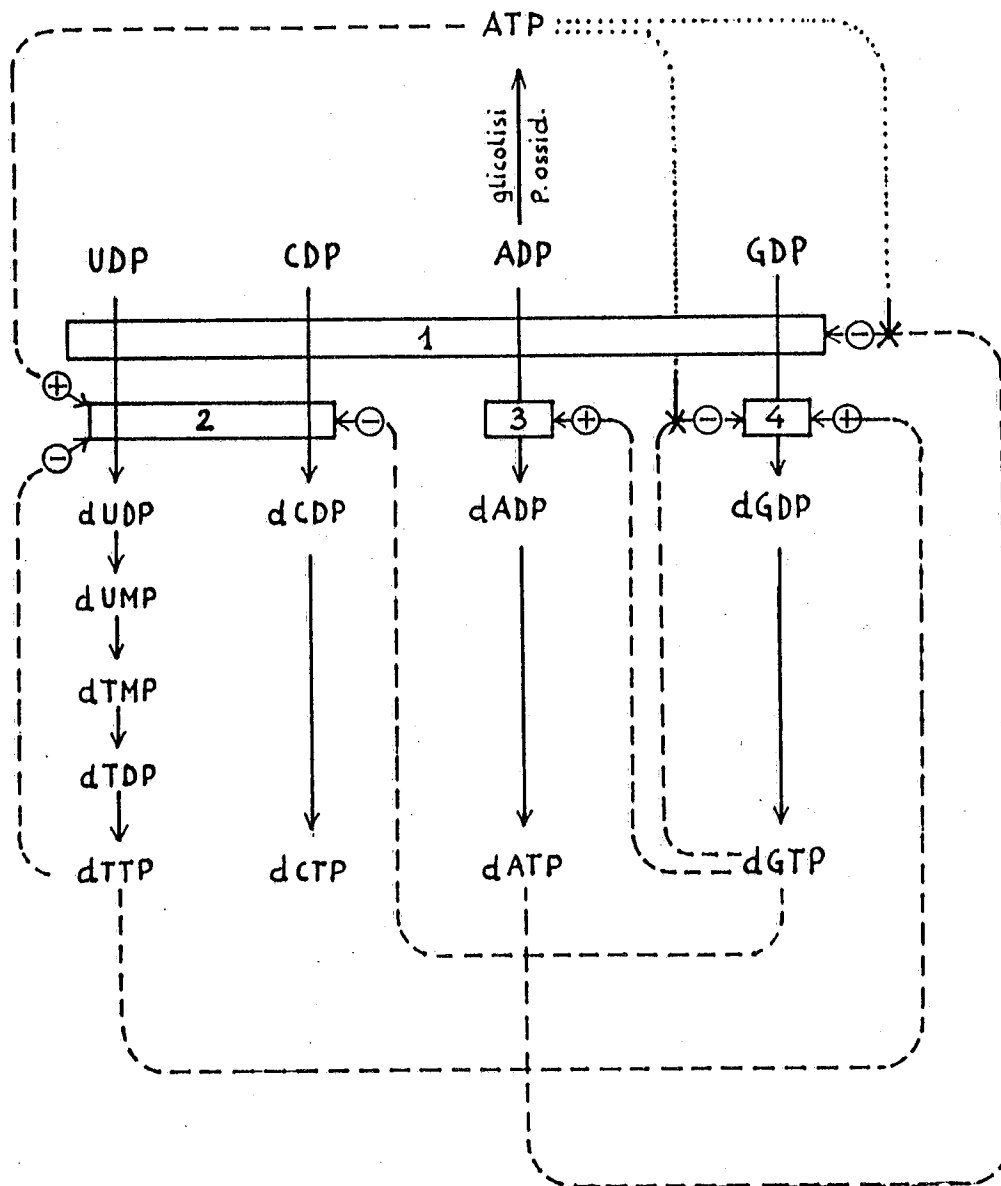


Fig. 7-18

Regolazione della sintesi dell'eme e dell'emoglobina negli eritroblasti di mammifero (uomo).

La sintesi dell'eme avviene soprattutto negli eritroblasti, ma si assume che la sua sintesi avvenga anche nei reticulociti, la sintesi della globina α e β (le subunità della Hb) avviene negli eritroblasti e nei reticulociti. I reticulociti sono cellule rosse immature, anucleate, e sono macchine per la sintesi proteica che sintetizzano principalmente Hb.

L'eme è effettore negativo della sua sintesi a livello degli enzimi AAL-sintetasi e Ferro-chelatasi. L'eme è attivatore della sintesi proteica a livello della traduzione e quindi stimola prevalentemente la sintesi dell' α e della β globina, essendo i loro mRNA i più abbondanti nei reticulociti. L'attivazione della sintesi proteica operata dall'eme, non è mRNA-specifica, per cui interessa la sintesi di tutte le proteine del reticulocita, inclusi gli enzimi per la sintesi dell'eme.

Le sintesi dell'eme e dell'Hb negli eritroblasti, sono sotto controllo di fattori del differenziamento che modificano l'espressione dei loro geni, provocando il loro differenziamento a reticulociti e poi ad eritrociti. L'azione di tali fattori, è responsabile del differente meccanismo della regolazione della sintesi dell'eme negli eritroblasti, rispetto a quella presente nel fegato (fig. 7-15) in relazione alle differenti funzioni dell'eme nei due tipi di cellula. La differente regolazione è basata su differenti patrimoni di proteine (enzimi, fattori, ecc.) presenti nel fegato adulto e nell'eritroblasto.

HCI = (Heme Controlled Inhibitor). Inibitore controllato dall'eme è la eIF2-cinasi che è inattiva in presenza di eme. L'eme inibisce sia la proteina cinasi cAMP-dipendente che la eIF2-cinasi non fosforilata, e così impedisce la fosforilazione e quindi l'inattivazione del eIF2. L'azione dell'eme su l'eIF2-cinasi (non fosforilata) è particolare, l'eme legandosi all'enzima impedisce che si autofosforili. Si assume che eIF2-cinasi complessata con l'eme non possa essere fosforilata da eIF2-cinasi fosforilata (attiva). In questo modo è impedita una via di attivazione del eIF2-cinasi.

Gli ormoni che possono opporsi alla sintesi delle proteine, sono quelli che incrementano la Css-AMP (es. glucagone, catecolamine).

Una alta Css-eme inibisce la sintesi dell'eme stesso per inibizione dell'ALA-sintetasi e contemporaneamente stimola la sintesi dell' α e β globina. L'eme si associa alle globine, per cui la Css-eme libera diminuisce ed in conseguenza diminuisce la sintesi delle globine mentre viene stimolata la sintesi di nuovo eme. Così avanti fino a quando la Css-eme è tale che l'eme è sintetizzato con velocità uguale alla sintesi delle globine.

I due meccanismi di regolazione, apparentemente antitetici, cooperano affinché la sintesi dell'eme avvenga con velocità

uguale a quella delle singole molecole di globine. Inoltre la sintesi dell' α e della β globina è regolata in modo da produrre quantità uguali di α e di β globina affinché si possano formare tetrameri di Hb, senza residui di α o di β globina, nè di eme.

In difetti genetici in cui si hanno residui di una o dell'altra globina, la globina in eccesso precipita all'interno del globulo rosso rendendo le membrane degli eritrociti più fragili e più disposti all'emolisi.

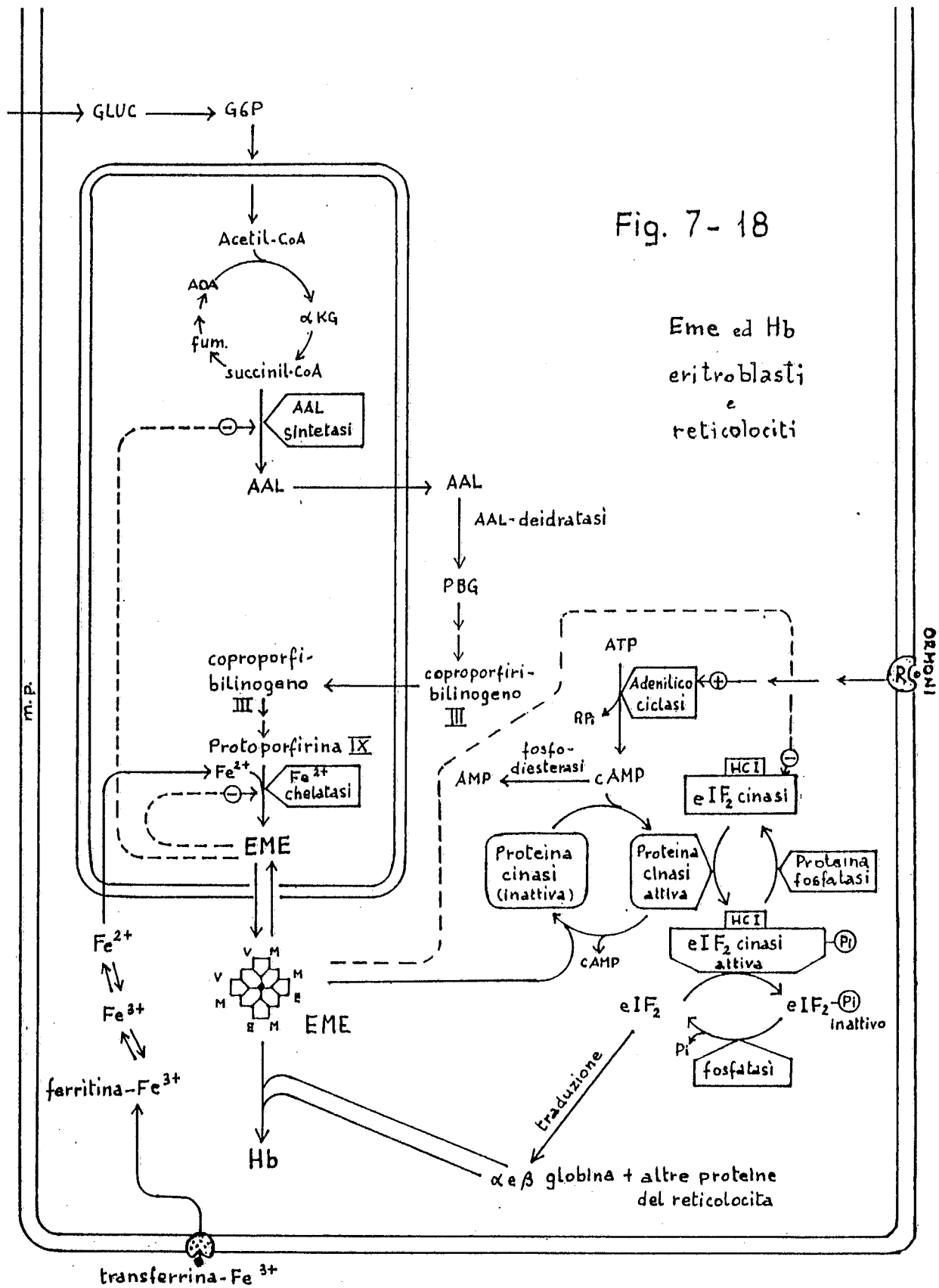


Fig. 7-19

Caratteristiche e metabolismo delle fibre dei muscoli scheletrici.

I muscoli scheletrici umani sono costituiti da gruppi di fibre di tipo I, IIA e IIB. La fibra muscolare è una cellula multinucleata di forma cilindrica allungata, contenente le proteine contrattili, mioglobina, le vie metaboliche per la sintesi di ATP, glicogeno, proteine e trigliceridi. Le fibre di tipo I e IIA corrispondono alle fibre rosse e le fibre di tipo IIB a quelle bianche della vecchia denominazione.

a)

1) I valori percentuali indicano il contributo alla sintesi di ATP dato da fosfocreatina, glucosio, glicogeno ed acidi grassi (palmitato). I valori sono stati calcolati dai dati del consumo di O_2 e dei 4 substrati della muscolatura di arti (gambe, avambraccio) e normalizzati alla muscolatura scheletrica totale (28 Kg) di un uomo normale di 70 Kg. e poi a valori per grammo di tessuto fresco (g T.F.), cioè vivente. Alcuni dati sono presi da esperimenti condotti su animali. L'utilizzazione dell' O_2 e dei 4 substrati dipende da vari fattori (durata, richiesta energetica e tipo di contrazione delle fibre, alimentazione e stato di allenamento dell'individuo, livello della C_{ss}-glucosio e C_{ss}-acidi grassi nel sangue), quindi i valori percentuali in figura danno solo con buona approssimazione l'indicazione del tipo di metabolismo delle fibre in riposo e quando si contraggono con le frequenze tipiche della fibra. I valori assoluti, μ mol di ATP sintetizzati, sono ancora più approssimati. Ciò è particolarmente vero per le fibre in riposo dove il glucosio ossidato per sintetizzare ATP è solo il 40% del glucosio preso dal sangue. La rimanente quota (60%) di glucosio è convertita in acido lattico ed alanina (vedere fig. 7-20).

Si assume che i tre tipi di fibra in riposo abbiano lo stesso tipo di metabolismo (aerobico), alimentato prevalentemente (circa 91%) da acidi grassi. Il metabolismo della fibra di tipo I è stato calcolato dal metabolismo della muscolatura di atleti campioni di maratona (42,2 Km in 2h10), assumendo che la muscolatura impegnata nella corsa contenga circa l'80% di fibre di tipo I e che si contragga con la stessa frequenza per circa 1 h, conferendo all'atleta la velocità di circa 20 km/h. Si assume che le contrazioni delle fibre I siano iniziate e mantenute con la stessa frequenza per escludere la fase anaerobica dell'inizio delle contrazioni e delle accelerazioni (b). Le contrazioni delle fibre I, pur conferendo velocità di circa 20 Km/h, sono dette lente rispetto a quelle veloci delle fibre IIB, che contraendosi al massimo portano gli atleti a velocità di circa 36 Km/h.

Il metabolismo delle fibre IIA è stato calcolato relativamente a quello delle fibre I, tenendo in considerazione le attività enzimatiche di ratti allenati e della tabella 2 (sottostante). Rispetto alle fibre I, le fibre IIA hanno: 1) la stessa capacità di utilizzare acidi grassi (stessi valori di attività acetil-carnitina transferasi); 2) maggiore capacità ossidativa degli

acetyl-CoA (maggiore attività citrato sintetasi), da ciò si deduce che le fibre IIA producano più NADH e quindi abbiano maggiore attività di fosforilazione ossidativa; 3) maggiore attività glicolitica (maggiore attività fosfofruttocinasi); 4) maggiore utilizzazione del glucosio ematico (maggiore attività esocinasi). L'attività glicogenolitica massima è stata calcolata per sottrazione dell'attività esocinasi massima dall'attività glicolitica massima. Da questi calcoli risulta che le fibre IIA possono produrre aerobicamente circa 3 volte più ATP di quello prodotto dalle fibre I, per cui possono contrarsi più rapidamente di queste. Tuttavia, poiché le fibre IIA utilizzano più glicogeno delle fibre I, devono avere una minore resistenza alla fatica (figg. 7-22, 7-24).

Nelle fibre IIA l'utilizzazione assoluta (μmoli) di acidi grassi può essere uguale a quella delle fibre I, percentualmente risulta inferiore perché le fibre IIA utilizzano in valore assoluto più glucosio e glicogeno di quello utilizzato dalle fibre I.

Sulla base dell'attività FFC massima delle fibre I, IIA e IIB, risulta che le fibre I, se costrette a produrre anaerobicamente ATP, ne producono circa il 30% in più, mentre le fibre IIA il 2,5% in meno. Da ciò si deduce che le contrazioni rapide utilizzate negli scatti di 100-200 m sono sostenute da fibre di tipo IIB che possono produrre anaerobicamente maggiori quantità di ATP nell'unità di tempo, anche se per breve durata. Per queste contrazioni le fibre IIB utilizzano nei primi 4 secondi P-creatina e nei successivi 16 secondi glicogeno contenuto nelle stesse fibre (vedere fig. 7-22).

Le fibre di tipo I sono altamente aerobiche e sono le fibre che utilizzano relativamente al glucosio e glicogeno la maggiore quantità di acidi grassi per produrre ATP per le loro contrazioni che sono di tipo lento.

Le fibre di tipo IIA sono aerobiche e per la contrazione, che è più veloce di quella delle fibre I, utilizzano relativamente meno acidi grassi e più glucosio, sia di origine endogena (glicogeno) che ematica.

Le fibre di tipo IIB sono anaerobiche e per la contrazione, che è veloce e di breve durata (es. corsa di 100 m), utilizzano quasi esclusivamente glucosio proveniente dal glicogeno e P-creatina; l'ATP prodotto aerobicamente varia da 0 a 1% a seconda della durata delle contrazioni.

2) Le attività enzimatiche assolute sono espresse in $\mu\text{moli/min/g}$ tessuto fresco a 35°C , le attività relative sono ottenute dando valore 100 all'attività della fosfofruttocinasi. L'alto valore di FFC rispetto a quello di esocinasi è spiegato considerando che su FFC converge G6P proveniente anche dal glicogeno per realizzare la veloce attività glicolitica anaerobica (vedere fig. 7-21).

Gli enzimi sono del muscolo di topo non allenato ed allenato.

N=non allenato; A=allenato; %=variazione percentuale rispetto al non allenato.

Le attività degli enzimi sono utilizzate come indicatori dell'attività delle vie metaboliche e/o della sorgente del substrato prima e dopo allenamento.

L'attività esocinasi indica l'utilizzazione del glucosio

ematico; l'attività fosfofruttocinasi il flusso glicolitico; l'attività citrato sintetasi l'attività ossidativa totale dell'acetil CoA proveniente da glucosio ed acidi grassi; l'attività carnitina-acil transferasi l'utilizzazione degli acidi grassi.

L'allenamento potenzia la capacità ossidativa dei tre tipi di fibra, con differenze che caratterizzano i diversi tipi di fibra.

Le fibre di tipo I incrementano l'utilizzazione sia del glucosio ematico (aumenta l'esocinasi) che degli acidi grassi (aumenta la carnitina acil-transferasi). L'incremento dell'esocinasi (50%) rispetto a quello della FFC (20%) suggerisce che le fibre abbiano ridotto l'utilizzazione del glicogeno contenuto nelle stesse fibre, per cui l'attività della glicolisi è aumentata relativamente poco perchè c'è stata soprattutto la sostituzione del glucosio ematico con glucosio-6-P proveniente dal glicogeno. L'incremento relativamente piccolo di attività della FFC suggerisce che il G6P proveniente dal glicogeno sia utilizzato anche aerobicamente. L'utilizzazione anaerobica del G6P richiede alta attività FFC perchè anaerobicamente sono prodotte solo 2 moli di ATP invece di 38 per mole di glucosio. Quindi, se il G6P proveniente dal glicogeno fosse stato metabolizzato tutto anaerobicamente, l'attività FFC sarebbe dovuta decrescere nelle fibre I allenate, come avviene nelle fibre IIA. Confrontando le attività della esocinasi e della FFC nei due tipi di fibra, si osserva che: nelle fibre I non allenate per una attività esocinasi di 1,6 è sufficiente una attività FFC di 20, mentre nelle fibre IIA con una attività di 1.5 occorre una attività FFC di 72. Ciò suggerisce che nelle fibre I l'attività glicolitica sia quasi esclusivamente aerobica.

Con l'allenamento le fibre di tipo IIA incrementano notevolmente l'utilizzazione del glucosio ematico (esocinasi) e degli acidi grassi (l'attività dell'acetil-carnitina transferasi è uguale a quella delle fibre I allenate). L'incremento dell'utilizzazione del glucosio è associato con la riduzione della glicolisi, suggerendo che nelle stesse fibre IIA non allenate venissero utilizzate anaerobicamente unità glucosidiche del glicogeno. L'incremento del metabolismo aerobico (indicato dalla citrato sintetasi) è in accordo con la riduzione dell'attività glicolitica (indicata dal FFC). Infatti, per ottenere nell'unità di tempo lo stesso numero di molecole di ATP occorrenti per la contrazione delle fibre IIA non allenate (che utilizzavano per produrre ATP anche la glicolisi anaerobica per sostenere la stessa velocità di contrazione delle fibre allenate), nelle fibre IIA allenate è sufficiente glicolizzare meno glucosio, perchè esso sarà metabolizzato aerobicamente e produrrà 38 ATP/glucosio contro le 3/glucosio della glicolisi anaerobica da unità glucosidiche del glicogeno. L'apparente disaccordo tra incremento dell'esocinasi e decremento della FFC è spiegato assumendo che con il potenziamento della citrato sintetasi, più glucosio viene metabolizzato aerobicamente producendo più ATP nell'unità di tempo facendo ridurre la quantità di glucosio metabolizzato anaerobicamente. Poichè nelle fibre muscolari la glicolisi anaerobica è sostenuta

prevalentemente dal glicogeno della fibra stessa, un decremento dell'utilizzazione del glicogeno è compensato da una maggiore utilizzazione di glucosio ematico.

Generalizzando, si può dire che le fibre I e IIA non allenate per produrre ATP, facciano più ricorso di quelle allenate alla glicolisi anaerobica da glicogeno.

L'allenamento potenziando il metabolismo aerobico, più lento ma più efficiente, può dare le stesse quantità di ATP nella stessa unità di tempo. Con l'allenamento anche le fibre IIB tipicamente anaerobiche, dotate di pochissimi mitocondri, incrementano notevolmente la loro capacità aerobica, utilizzando come in quelle non allenate, quasi

esclusivamente il glicogeno contenuto nelle fibre stesse.

Tuttavia nelle fibre IIB allenate una quantità maggiore di glicogeno viene metabolizzata aerobicamente, per cui (come visto per le fibre IIA) è sufficiente una minore attività glicolitica. Con l'allenamento le fibre IIB incrementano anche il metabolismo degli acidi grassi. Si assume che gli acidi grassi siano utilizzati esclusivamente per produrre energia delle fibre in riposo e che l'incremento di carnitina-acil-transferasi sia in relazione al maggior metabolismo aerobico conseguente all'ipertrofia delle fibre indotta dall'allenamento sulle stesse fibre.

Le fibre IIB si contraggono molto rapidamente e la β -ossidazione che è regolata da substrato, non appare in grado di rispondere velocemente alla richiesta di ATP di una fibra che passa dal riposo alla contrazione (vedere b,c,d,e). Anche nelle fibre IIB allenate la sintesi di ATP è quasi totalmente anaerobica ed utilizza le riserve di p-creatina e di glicogeno delle fibre stesse.

La riduzione della attività glicolitica con il passaggio del metabolismo anaerobico a quello aerobico, è detto effetto Pasteur, lo scienziato che lo osservò per primo nei lieviti. Successivamente, quando fu stabilito che i due tipi di metabolismo producevano quantità diverse di ATP da una stessa molecola di glucosio, divenne evidente che la glicolisi anaerobica doveva avere una velocità teorica di circa 19 volte superiore a quella della glicolisi aerobica per produrre la stessa quantità di ATP.

Nei muscoli umani allenati la quantità massima di ATP prodotto anaerobicamente nell'unità di tempo, è circa 5 volte superiore a quella prodotta aerobicamente (si assume che due atleti allenati, dello stesso peso, corrano rispettivamente a 20 e 36 Km/h sostenuti rispettivamente da fibre I e fibre IIB).

Ciò indica che la glicolisi anaerobica è sufficientemente veloce da compensare la sua scarsa efficienza (3/38 di quella della glicolisi aerobica) e di superare la produzione di ATP dell'attività massima della glicolisi aerobica.

b,c,d,e) Evoluzione del metabolismo per la sintesi di ATP nelle fibre muscolari dalle condizioni di riposo (b), inizio delle contrazioni (c) e contrazioni di regime (d) tipiche delle fibre I, IIA e IIB. I dati sono sommarizzati in e).

I valori sono stati calcolati utilizzando i dati e le assunzioni precedentemente indicati (questa figura a).

I dati nei riquadri si riferiscono a tutta la muscolatura (28 Kg) di un uomo (70 Kg) per min (riquadro alto) e per s

(riquadro basso). Le contrazioni di regime sono le contrazioni massime aerobiche per le fibre I e IIA e massime anaerobiche per le fibre IIB.

Gli schemi mettono in evidenza:

- 1) Il forte incremento di sintesi di ATP nel passaggio da riposo, prime contrazioni e contrazioni di regime.
- 2) La velocità della β -ossidazione è bassa relativamente a quella della glicolisi e l'incremento di velocità della β -ossidazione da riposo a contrazioni di regime è inferiore a quello della glicolisi.
- 3) I tre tipi di fibra hanno capacità di sintesi di ATP, e quindi di potenza, diverse ($IIB > IIA > I$) sia nelle prime contrazioni (anaerobie per tutte le fibre) che nelle contrazioni di regime (aerobie per le fibre I e IIA ed anaerobie per le fibre IIB).
- 4) Le fibre IIA, operando al massimo sia la glicolisi anaerobia che quella aerobia, sintetizzano nell'unità di tempo circa la stessa quantità di ATP, suggerendo che la "scelta" dei due tipi di metabolismo è sulla base della disponibilità di O_2 piuttosto che dettata dalla necessità di sintetizzare più ATP con le contrazioni anaerobie.
- 5) Dai punti 3 e 4 si ha la conferma che le fibre diverse sono reclutate per svolgere sforzi di intensità diversa, in relazione alla loro capacità di sintesi di ATP. Ciò appare vero anche per le contrazioni iniziali e isometriche e nelle accelerazioni (vedere punto 6).
- 6) Si assume che le accelerazioni delle fibre I e IIA che si contraggono aerobicamente a regime siano anaerobiche, perchè con l'accelerazione si ha un deficit di O_2 che crea l'incremento della C_{ss}-NADH mitocondriale. L'incremento del NADH crea il rallentamento del ciclo di Krebs e PDH, quindi l'inibizione dell'ossidazione del piruvato che viene così convertito in lattato. Questo meccanismo attiva la glicolisi anaerobica e quindi un apporto di ATP oltre quello sintetizzato aerobicamente. Poichè la velocità massima della glicolisi in condizioni aerobie è una piccola frazione di quella massima anaerobica, in via teorica si potrebbe ammettere che i due tipi di glicolisi funzionassero contemporaneamente ed al massimo, raddoppiando circa la produzione di ATP. Tuttavia il deficit di O_2 , via NADH e citrato, deve causare un rallentamento della glicolisi aerobia ed anaerobia e quindi appare improbabile che le due vie di sintesi (aerobia ed anaerobia) possano coesistere con le loro massime attività nella stessa fibra che si contrae. Questi effetti non si verificano con le fibre IIB, perchè essendo esse prive di mitocondri, non accumulano citrato. Infatti, basandosi solo su i calcoli delle massime potenzialità aerobie ed anaerobie, risulterebbe che nelle fibre I e IIA le due vie di sintesi produrrebbero più ATP di quello prodotto dalle fibre IIB. Quindi, le fibre I e IIA dovrebbero poter contrarsi più velocemente, delle fibre IIB, mentre è provato il contrario.

Fig. 7-19 a

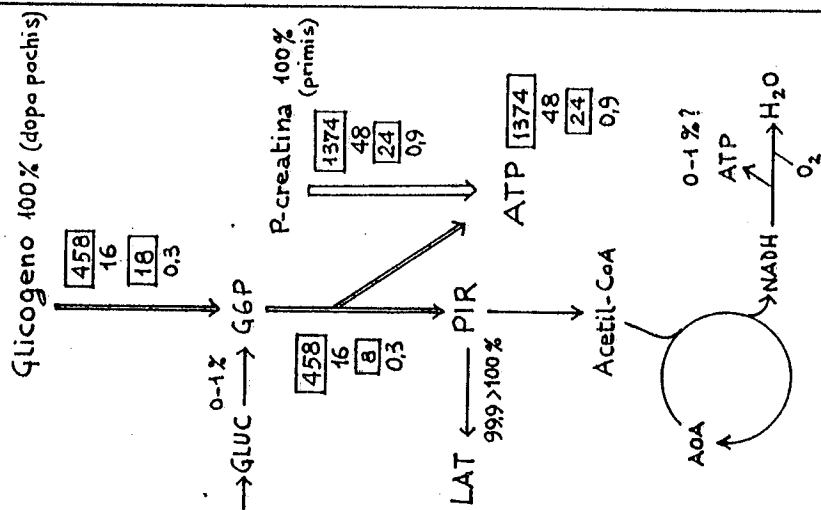
TIPO DI FIBRA	I (rosse)	II A (rosse)	II B (bianche)
Contrazione	lenta	medio-veloce	veloce
Resistenza alla fatica	alta	media	scarsa
capacità glicolitica	bassa	media	alta
capacità ossidativa	alta	molto alta	bassa
vascolarizzazione capillare	buona	buona	scarsa
Deposito di trigliceridi	alto	moderato	basso
Deposito di glicogeno	alto	alto	alto
contenuto di Mb	alto	alto	basso
Localizzazione nel muscolo	profonda	intermedia	superficie

RIPOSO 1		CONTRAZIONE 1	
<p>Glicogeno 9% ↓ ~0% GLUC → G6P 9% ↓ LAT ← PIR Ac. grassi 91% Acetil-CoA ATP AOA H₂O O₂</p>	<p>Glicogeno 38% ↓ 15% GLUC → G6P 53% ↓ LAT ← PIR Ac. grassi 47% Acetil-CoA ATP AOA H₂O O₂</p>	<p>Glicogeno 22% ↓ 63% GLUC → G6P 85% ↓ LAT ← PIR Ac. grassi 15% Acetil-CoA ATP AOA H₂O O₂</p>	<p>Glicogeno 0.1% ↓ (~16s) 100% GLUC → G6P (primi 4s) p-creatina ATP 100% LAT ← PIR Acetil-CoA 0 → 1% ATP AOA H₂O O₂</p>
Sintesi ATP $\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{g TF}} = 0,54$ relativo 1	38 ~70	122 ~226	180 ~333

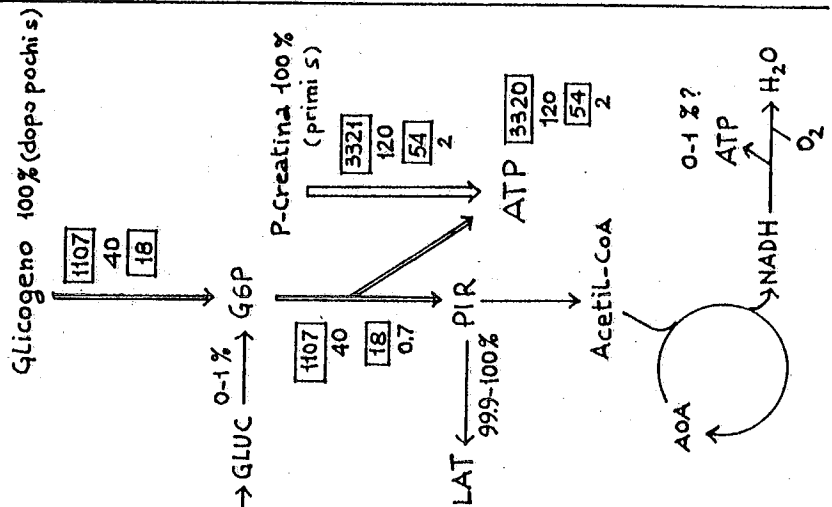
Enzimi muscolo di ratto 2		ATTIVITÀ 2																				
		Assoluta			%	Relativa			Assoluta			%	Relativa			Assoluta			%	Relativa		
		N	A			N	A		N	A			N	A		N	A			N	A	
Esocinasi		1.6	2.4	50	8	10	1.5	4.1	173	2	7	0.6	0.7	17	0.6	0.8						
Fosfofruttocinasi		20	24	20	100	100	72	58	-19	100	100	96	88	-8	100	100						
citrato sintetasi		23	41	35	115	170	35	70	100	49	121	10	18	80	10	20						
Carnitina-acil-transferasi		0,6	1,2	100	3	5	0,7	1,2	71	1	2	0,1	0,2	100	0,1	0,2						
FIBRE		I				II A				II B												

Prime contrazioni, contrazioni isometriche, accelerazioni Fig. 7-19 c

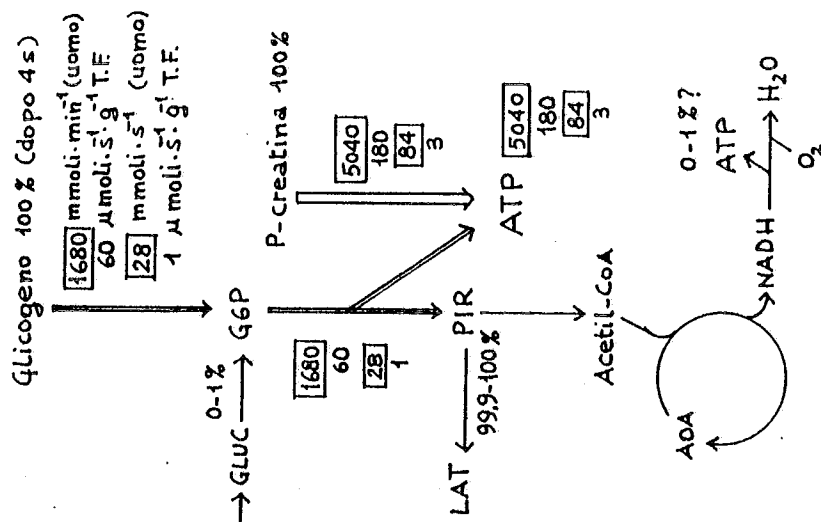
Fibre I



Fibre II A



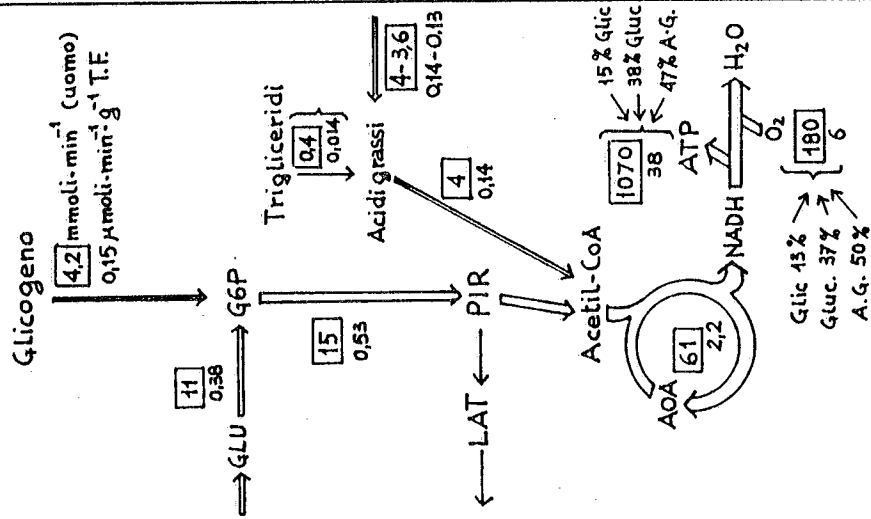
Fibre II B



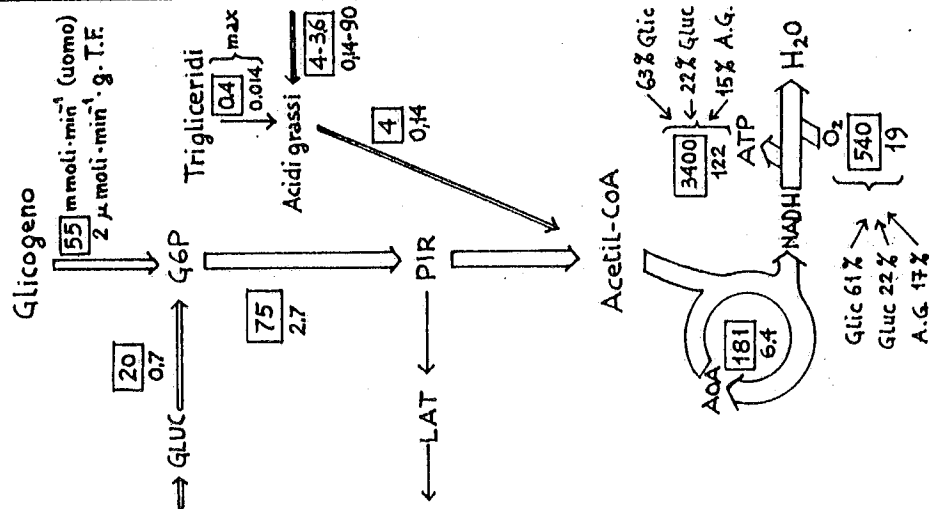
CONTRAZIONE

Fig 7-19 d

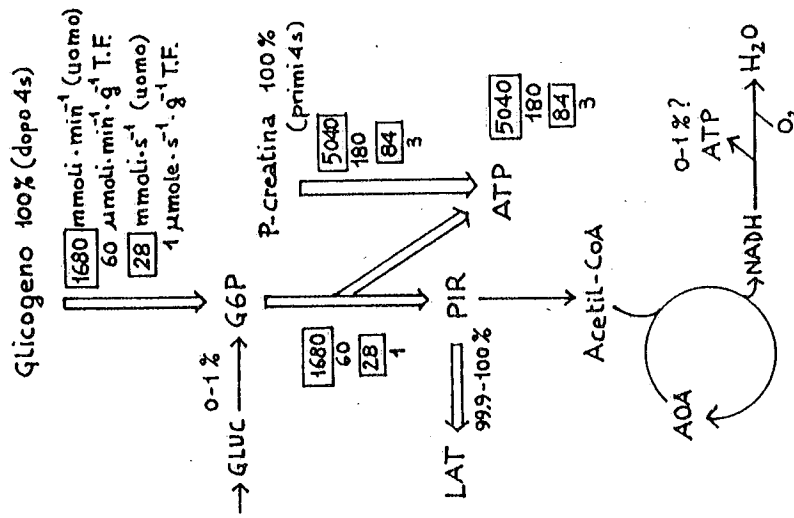
Fibre I



Fibre II A



Fibre II B



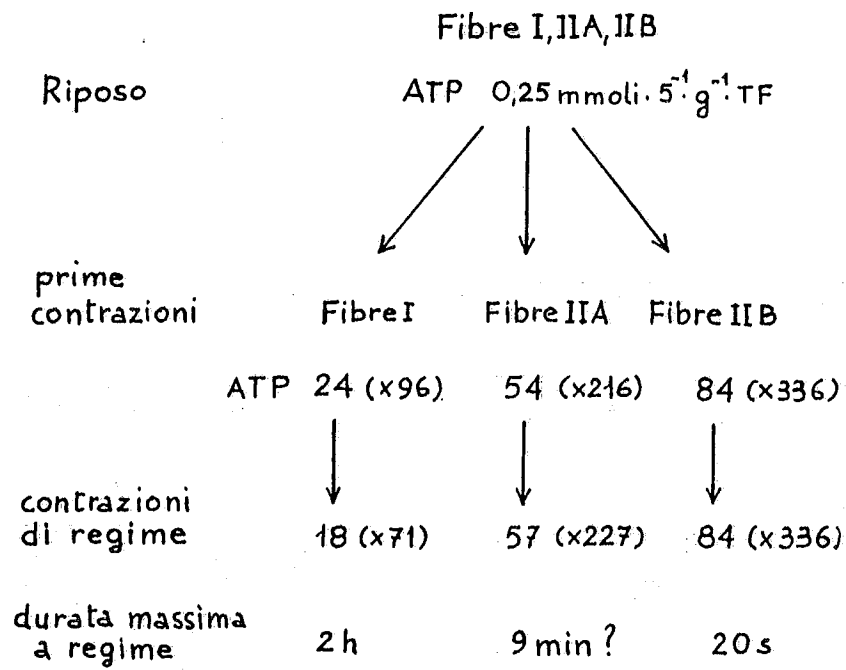


Fig. 7-19 e

Fig. 7-20

Schema della regolazione da substrato e da effettore del sistema glicolisi-ciclo di Krebs-P-ossidativa e della β -ossidazione nelle fibre muscolari di tipo I, IIA, e IIB in condizioni di riposo.

I tre tipi di fibra hanno capacità metaboliche aerobiche molto diverse, tuttavia in condizioni di riposo hanno tutte un metabolismo di tipo aerobico con utilizzazione di glucosio, di acidi grassi e corpi chetonici (quando presenti), tutti provenienti dal sangue, ma soprattutto acidi grassi. Più del 90% dell'ATP sintetizzato è prodotto da acidi grassi. Il consumo energetico delle fibre in riposo è molto basso, rispettivamente circa 70, 226 e 333 volte inferiore a quello delle fibre I, IIA, IIB in contrazione. Si assume che i tre tipi di fibra consumino e quindi sintetizzino nell'unità di tempo e per 1 g del loro peso fresco circa la stessa quantità di ATP (vedere fig. 7-19). Anche le fibre IIB, che hanno rispetto alle altre fibre una scarsa capacità di sintesi aerobica di ATP, in condizioni di riposo, data la scarsa richiesta di energia, sintetizzano ATP per via aerobica utilizzando circa la stessa quantità di acidi grassi delle altre fibre. Ciò è dedotto dal fatto che le fibre IIB hanno un contenuto di carnitina-acil-transferasi sufficiente a sostenere la β -ossidazione in condizioni di riposo.

L'utilizzazione degli acidi grassi e corpi chetonici, oltre a fornire Acetil-CoA per la produzione di energia, causa una forte inibizione nell'utilizzazione del glucosio e del glicogeno, attraverso gli effetti diretti del NADH su piruvato deidrogenasi (PDH) ed α -cheto-glutarato deidrogenasi (α KG-DH) ed indiretti sulla fosfofruttocinasi (FFC). La FFC è inibita da citrato la cui C_{ss} aumenta nel mitocondrio e nel citoplasma a causa dell'inibizione delle IDH, con il meccanismo descritto nella fig. 7-2. Il meccanismo è simile a quello descritto per il fegato (figg. 7-5+7-8), con la differenza che nel muscolo scheletrico la PC è inibita da ATP e P-creatina e non da Acetil-CoA ed alanina come la PC epatica. La PC delle fibre muscolari è insensibile a questi due ultimi effettori ed alla regolazione ormonale via reazioni di fosforilazione-defosforilazione a cui è sensibile la PC epatica (fig. 7-9). Le condizioni metaboliche in cui l'utilizzazione dell'ATP avviene lentamente, come in condizioni di riposo, sono caratterizzate da C_{ss}-ATP e C_{ss}-P-creatina alte, per cui ATP e P-creatina causano una ulteriore inibizione della glicolisi e ciclo di Krebs. La P-ossidativa è rallentata perchè la C_{ss}-ADP è bassa essendo la C_{ss}-ATP alta. In queste condizioni, il glucosio contribuisce solo per il 9% alla sintesi aerobica dell'ATP. Circa la stessa quantità di glucosio è glicolizzata anaerobicamente e porta alla formazione di alanina e soprattutto di acido lattico. Il contributo alla sintesi di ATP è molto scarso (1/19 di quello prodotto aerobicamente). La glicolisi anaerobica in condizioni di riposo è alimentata da glucosio ematico e la sua funzione è spiegata considerando che il piruvato prodotto è rapidamente e

continuamente in equilibrio con l'acido lattico nella reazione catalizzata dalla LDH, enzima altamente concentrato nelle fibre e non regolato da effettore, mentre il piruvato troverà l'enzima PDH cronicamente quasi completamente inibito da C_{ss}-NADH, C_{ss}-Acetil-CoA e C_{ss}-ATP relativamente alte. Si assume che la necessità di avere un'alta attività LDH, al fine di poter operare quando occorre una rapida glicolisi anaerobica, sia responsabile della glicolisi anaerobica osservata nella fibra in condizioni di riposo. Questa glicolisi anaerobica, che ha scarsa entità, contribuisce pochissimo alla produzione di ATP nelle condizioni di riposo. Tuttavia essa svolge un ruolo importante quando le fibre iniziano a contrarsi e nelle contrazioni veloci (figg. 7-19, 7-22b) la regolazione dell'utilizzazione degli acidi grassi e corpi chetonici, rispettivamente provenienti dal tessuto adiposo e dal fegato, è da substrato. Le fibre muscolari a riposo, od in contrazione, utilizzano acidi grassi in relazione alla concentrazione ematica degli stessi. La concentrazione ematica di acidi grassi e corpi chetonici è regolata da ormoni (fig. 7-11). La richiesta energetica delle fibre muscolari in riposo è molto bassa, ed anche le normali basse C_{ss}-ematiche di acidi grassi sono sufficienti a sostenere la produzione di ATP. Inoltre le fibre hanno un proprio deposito di trigliceridi e possono utilizzare acidi grassi endogeni quando gli acidi grassi ematici sono insufficienti. La regolazione dell'utilizzazione degli acil-CoA nella fibra muscolare è da substrato come quella descritta negli epatociti (fig. 7-7). Se la C_{ss}-ATP è alta (C_{ss}-ADP bassa) la P-ossidativa rallenta, quindi la C_{ss}-NADH aumenta ed inibisce IDH e quindi il ciclo di Krebs rallenta. Gli acetil-CoA aumentano in concentrazione e questo impoverisce i mitocondri di CoA libero. Ciò porta ad un rallentamento nella attività della carnitina-acil-transferasi II perchè manca l'accettore (CoA) dell'acile. L'accumulo di acil-carnitina e quindi ad un rallentamento nel trasporto di acili all'interno del mitocondrio, causa l'accumulo di acil-CoA anche nel citoplasma, fino a quando quasi tutto il CoA citoplasmatico si trova nella forma acilata. Ciò causa il rallentamento della reazione che converte gli acidi grassi in acil-CoA (acil-CoA sintetasi) per mancanza del coenzima CoA. La C_{ss}-acidi grassi aumenta nel citoplasma e rallenta il flusso degli acidi grassi dal sangue, perchè il flusso dipende dai valori relativi della concentrazione di acidi grassi nel sangue e nel citoplasma. Analoghe considerazioni si possono fare per i corpi chetonici, che se non sono utilizzati finiscono per impoverire i mitocondri ed il citoplasma di CoA, e quindi causare un rallentamento della loro utilizzazione. Quando la cellula riprende ad utilizzare acetil-CoA, il sistema di equilibrio si sposta automaticamente in senso contrario. L'utilizzazione degli acidi grassi e corpi chetonici riduce l'utilizzazione di glucosio. Se la richiesta di ATP aumenta, ma non aumenta congruamente anche l'apporto di acidi grassi e corpi chetonici, la cellula preleverà una quota maggiore di glucosio. Ciò avviene tutte le volte che la richiesta di ATP aumenta rapidamente.

Se le fibre rimangono in riposo è improbabile che ci siano richieste rapide di ATP. Come precedentemente detto, il minimo flusso glicolitico che è presente nella fibra a riposo, è mantenuto per avere una rapida attivazione della glicolisi all'inizio delle contrazioni.

Sebbene nel sangue il glucosio (4,5 mM) sia circa 7 volte più concentrato degli acidi grassi (0,66 mM), le fibre in riposo utilizzano preferenzialmente questi ultimi. Questa preferenza dell'utilizzazione degli acidi grassi può essere spiegata assumendo che la bassa richiesta di ATP provochi basse C_{ss}-ADP (anche quando gli acetil-CoA provengono solo dal glucosio), per cui l'IDH rimane parzialmente inibita innescando il meccanismo di inibizione della FFC operato da citrato. Un simile meccanismo di inibizione non esiste per la β -ossidazione, per cui la fibra rallenterà l'utilizzazione di glucosio ma non quella degli acidi grassi. L'utilizzazione di acidi grassi favorisce l'incremento della C_{ss}-NADH (fig. 7-2), quindi l'ulteriore inibizione della IDH, e quindi della glicolisi. Quindi se la richiesta di ATP non è rapida, la C_{ss}-ATP non si abbassa troppo e la fibra è congruamente rifornita di acidi grassi, la β -ossidazione finisce per prevalere sulla glicolisi come produttore di coenzimi ridotti per la sintesi di ATP. In queste condizioni, l'attivazione della glicolisi può essere operata solo per riduzione delle C_{ss}-ATP per produrre ATP oltre a quello prodotto da acidi grassi. La β -ossidazione finisce per prevalere sulla glicolisi, perchè la β -ossidazione è regolata da substrato mentre la glicolisi è regolata da effettore ed è cronicamente inibita da citrato e da ATP.

Fig. 7-20

FIBRE MUSCOLARI
tipo I, IIA, IIB
in riposo

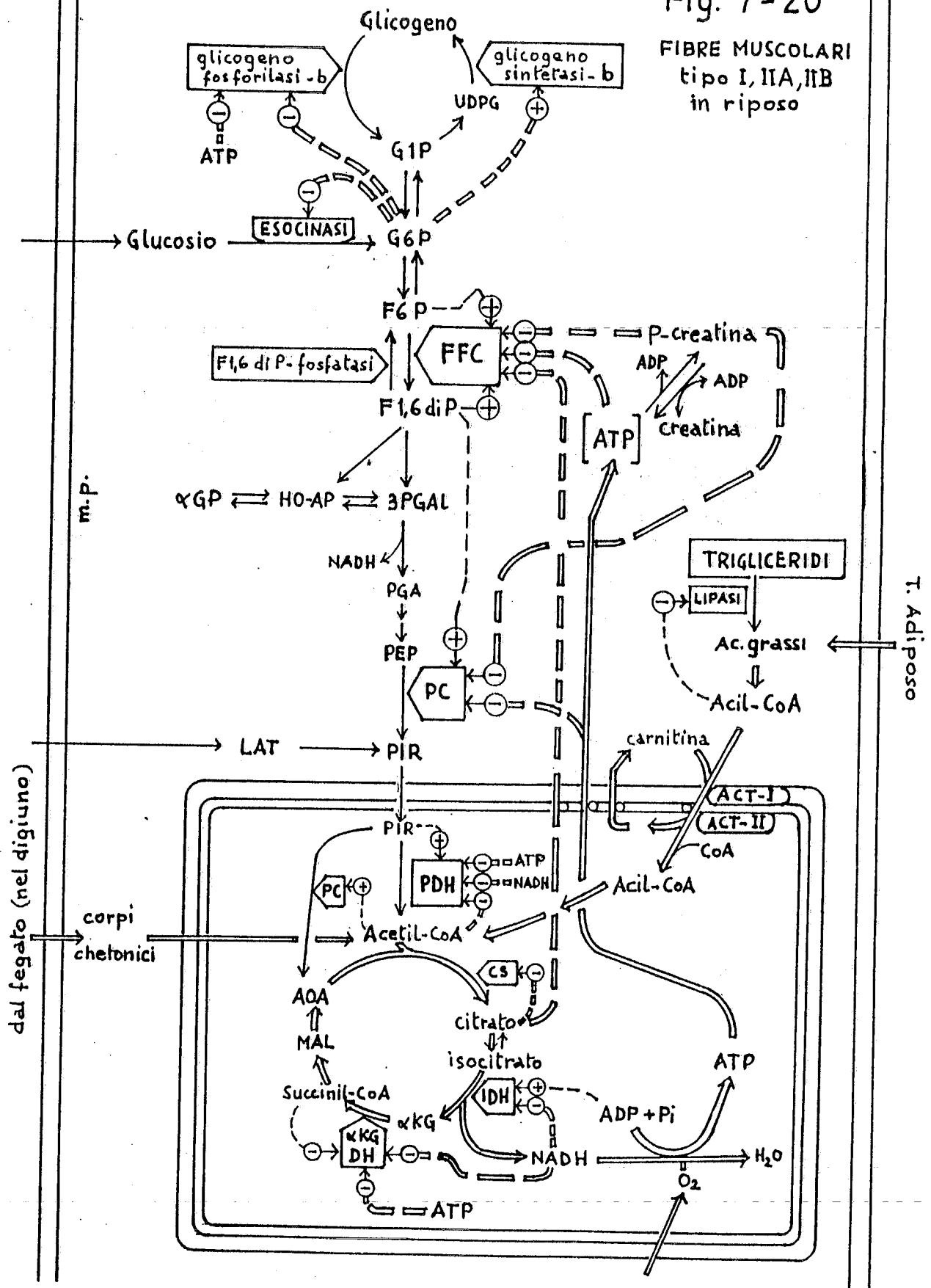


Fig. 7-21

Produzione di ATP nei primi minuti di contrazione delle fibre muscolari scheletriche.

La figura mostra che l'avambraccio umano, quando inizia a contrarsi, per circa 10 minuti produce ATP per via anaerobia utilizzando prima esclusivamente e poi prevalentemente la propria riserva di glicogeno. Ciò è indicato dal fatto che nei primi 3 minuti di contrazione l'avambraccio libera una grande quantità di acido lattico (più di 60 volte rispetto alle condizioni di riposo), senza assumere glucosio dal sangue. Nei successivi 7 minuti l'assunzione di glucosio aumenta ma è molto inferiore all'acido lattico liberato (solo il 25% dell'acido lattico proviene dal glucosio) indicando che la sintesi dell'ATP avviene anaerobicamente ed è sostenuta prevalentemente (75%) dal glicogeno delle fibre muscolari.

Occorrono più di 60 min affinché la velocità di rilascio del lattato nel sangue scenda a valori bassi che tuttavia sono 2-3 volte più alti di quelli osservati nell'avambraccio a riposo. Per facilitare il confronto tra acido lattico liberato e glucosio assunto (2 molecole di acido lattico sono prodotte da 1 di glucosio), la scala riguardante l'acido lattico ha valori doppi rispetto a quella del glucosio.

La lattemia cresce relativamente poco, da 1,1 mM della condizione di riposo si passa a 1,3 mM dopo 40 min. ed a 1,4 mM dopo 180 min. (non indicata in figura). I dati della lattemia sono stati ottenuti prelevando il sangue da uomini che si esercitavano su biciclette. Se si fosse dosata la lattemia di soggetti che contraevano solo l'avambraccio, l'incremento di lattemia sarebbe stato minore dato il numero minore di fibre che si contraevano.

La ragione per la quale le fibre muscolari di tipo I e IIA, (che sono altamente aerobiche) sebbene dotate di una notevole vascolarizzazione e di un alto contenuto di Mb), eseguono le prime contrazioni anaerobicamente, sta nel fatto che passando in poche frazioni di secondo dal riposo alla contrazione, incrementano il consumo di ATP di circa 70 volte se le contrazioni sono relativamente "lente" (corsa per la maratona di atleti campioni), e di circa 300 volte se le contrazioni sono rapide (corsa di 100 m di atleti campioni). Mentre un incremento significativo di apporto ematico e quindi di substrati e di O_2 , avviene dopo 5-10 minuti di contrazioni (o più se i muscoli non sono allenati).

L'incremento dell'apporto ematico richiede vasodilatazione a livello del muscolo che si contrae, vasocostrizione in altri distretti dell'organismo e dipende dalla gittata cardiaca. Nonostante che le fibre di tipo I e IIA abbiano un alto contenuto di Mb- O_2 , ed una certa quantità di O_2 sia presente nei capillari che le irrorano, la PDH ed il ciclo di Krebs sono rapidamente inibiti dall'accumularsi del NADH nei mitocondri, conseguente l'alto incremento nella velocità di sintesi del piruvato e quindi di acetil CoA, mentre la disponibilità di O_2 rimane invariata per almeno 3 min. Successivamente l'apporto di O_2 aumenta ma rimane insufficiente per altri 7-10 min. La grande quantità di

piruvato è prodotta dalla glicolisi, attivata per disinibizione della FFC conseguente la riduzione della C_{ss}-P-creatina e della C_{ss}-ATP. La riduzione della C_{ss}-P-creatina e della C_{ss}-ATP sono causate dalla grande utilizzazione di ATP per le contrazioni. La rigenerazione dell'ATP dalla P-creatina dura solo i primi 4 secondi di contrazioni. La glicolisi è alimentata dal glicogeno contenuto nelle fibre stesse, perchè il glucosio ematico, come l'O₂, non sono riforniti con sufficiente velocità. L'acido piruvico prodotto, non essendo o essendo convertito troppo lentamente in acetil-CoA, si combina con il NADH (che tende ad aumentare in C_{ss}), formando lattato e NAD⁺ nella reazione catalizzata dalla lattico deidrogenasi (LDH). Il lattato è esportato dalla fibra nel sangue. La reazione LDH, oltre ad eliminare l'eccesso di piruvato che finirebbe per bloccare la reazione piruvato cinasica, ha anche l'importante ruolo di riossidare il NADH a NAD⁺ e permettere che la reazione 3P-Gal-deidrogenasi (che utilizza NAD⁺) possa procedere, e con essa anche la glicolisi. Il NAD⁺ è presente nelle cellule in basse concentrazioni, circa 0,8 µmoli/g di tessuto fresco, ed in meno di un secondo di glicolisi sarebbe tutto trasformato in NADH. Ciò causerebbe l'arresto della glicolisi a livello della reazione 3P-Gal-DH se, nelle contrazioni anaerobie, il NADH non venisse rapidamente riformato nella reazione lattico deidrogenasica. Le fibre di tipo IIA, all'inizio delle contrazioni, producono ATP in anaerobiosi come visto per le fibre I. Le fibre di tipo IIB sono sempre anaerobie, all'inizio e dopo molte contrazioni. La regolazione del metabolismo delle fibre IIB in contrazione (fig. 7-22b), è simile alla regolazione delle fibre di tipo I e IIA all'inizio delle loro contrazioni (i primi 3 min) (fig. 7-19). L'acido lattico prodotto dalle fibre muscolari è trasportato per via ematica al fegato e reni, che lo convertono, mediante la gluconeogenesi, in glucosio, che viene rimesso in circolo. Si assume che, in relazione alla velocità delle prime contrazioni di un dato muscolo, siano reclutate fibre di tipo diverso. Le fibre IIB sarebbero responsabili delle contrazioni rapide, le fibre IIB di quelle intermedie e le fibre I di quelle lente. Cioè in relazione alla loro capacità massima di sintesi di ATP per via glicolitica anaerobia (fig. 7-19).

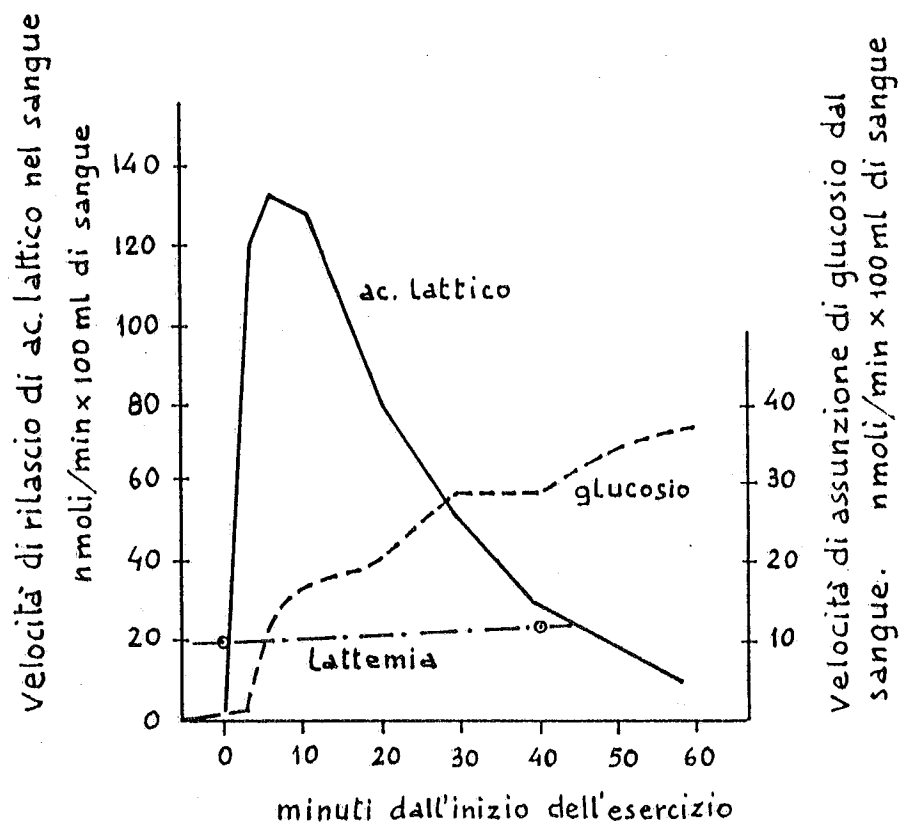


Fig. 7-21

Fig. 7-22

Schema della regolazione da substrato, da effettore e da ormone del sistema glicolisi-ciclo di Krebs-P-ossidativa e β -ossidazione nelle fibre del muscolo scheletrico durante la contrazione.

Tutti i muscoli umani contengono fibre di tipo I e IIA e IIB.

Le fibre di tipo I prevalgono (oltre il 70% e fino al 90%) nei muscoli di atleti allenati per sforzi muscolari prolungati (corse e sci di fondo su distanze 20-100 Km), mentre le fibre di tipo II prevalgono (oltre il 70% fino all'80%) nei muscoli di atleti allenati per corse veloci (60-200 m).

a) Fibre di tipo I.

Lo schema si riferisce a circa 40-90 min dopo l'inizio delle contrazioni lente mantenute a frequenza costante di regime, cioè con una frequenza di contrazione che le fibre I possono sostenere aerobicamente.

Le fibre hanno già superato la fase iniziale di contrazioni anaerobiche (figg. 7-19, 7-20).

40 min dopo l'inizio delle contrazioni, le fibre di tipo I che continuano a contrarsi, sono regolate in maniera molto simile alla stessa fibra in riposo, con alcune differenze: circa la metà dell'ATP richiesto nell'unità di tempo è prodotto da acidi grassi (circa 47%), la rimanente richiesta di ATP è sostenuta soprattutto da glucosio ematico (glucosio 38% e glicogeno 15%) (vedere fig. 7-19).

Quando le fibre si contraggono aerobicamente il glicogeno è utilizzato in quantità progressivamente decrescenti nel tempo, sostituito prima dal glucosio proveniente dal sangue (circa i primi 40-90 min) e poi dagli acidi grassi (fig. 7-24b), in modo che la quantità di ATP sintetizzato rimanga costante nel tempo. Quando il glicogeno contenuto nelle fibre che si contraggono è quasi tutto utilizzato, la fibra non può contrarsi più con la stessa frequenza (vedere dopo). Il glicogeno non viene mai completamente degradato perché per risintetizzarlo occorre iniziare da una molecola di glicogeno. I corpi chetonici sono utilizzati poco, perché scarsamente presenti nel sangue durante lo sforzo muscolare prolungato (fig. 7-24b). In condizioni di digiuno, quando la C_{ss}-corpi-chetonici è più alta nel sangue, una quota maggiore di corpi chetonici è utilizzata in sostituzione degli acidi grassi. L'utilizzazione degli acidi grassi riduce l'utilizzazione del glucosio attraverso lo stesso meccanismo descritto per il muscolo in riposo. L'eccesso di NADH mitocondriale, e in conseguenza di questo l'eccesso di acetil-CoA e di citrato, inibiscono glicolisi e PDH.

Superata la fase iniziale anaerobica, quando la fibra I si contrae a regime anaerobico, la C_{ss}-P-creatina ritorna ad essere uguale a quella di riposo, per cui la glicolisi è rallentata ulteriormente per l'azione inibitoria della P-creatina su FFC e PC. A differenza di ciò che accade nella fibra a riposo, nella fibra I in contrazione, l'inibizione da ATP degli enzimi del sistema GLI-CIK-PO è ridotta perché la C_{ss}-ATP è più bassa in conseguenza dell'utilizzazione

dell'ATP per la contrazione. Da ciò risulta che la fibra di tipo I in contrazione, rispetto al riposo, utilizza molto più glucosio e anche glicogeno per produrre ATP (fig. 7-19). In qualsiasi momento, un aumento della richiesta di ATP che provochi un abbassamento rapido della C_{ss}-ATP, si ha un incremento dell'utilizzazione di glucosio perchè la β -ossidazione non risponde prontamente a variazioni di C_{ss}-ATP. L'incremento della glicolisi è istantaneo, mentre l'incremento della β -ossidazione richiede decine di minuti. Nel quadricipite dell'uomo, la C_{ss}-ATP passa da 5,2 mM (riposo) a 4,7 mM (circa 10% di riduzione) durante la contrazione. La riduzione della C_{ss}-ATP è tale che l'ATP si dissocia dagli enzimi come effettore, mentre come substrato è ancora capace di saturare gli enzimi stessi e l'ATPasi miosinica. L'incremento della C_{ss}-ADP attiva la P-ossidativa. Anche durante le contrazioni, l'ATP è il pace-maker del sistema glicolisi-ciclo di Krebs-P-ossidativa perchè se la richiesta di ATP aumenta (es. accelerazione durante la corsa), l'abbassamento della C_{ss}-ATP attiva immediatamente la glicolisi. Nei primi secondi dell'accelerazione durante la corsa, l'ATP è generato da P-creatina (in anaerobiosi). L'abbassamento della C_{ss}-P-creatina attiva la glicolisi per disinibizione delle FFC e PC, in modo da stimolare la sintesi di ATP anche se la C_{ss}-ATP non si è ancora abbassata o si è abbassata molto poco. Tuttavia, dopo pochi secondi, la P-creatina contenuta nella fibre si riduce fortemente e non può sostenere come prima la sintesi dell'ATP. Se il ritmo accelerato della corsa continua, la C_{ss}-ATP si abbassa ulteriormente disinibendo gli enzimi della glicogenolisi e glicolisi (FFC, PC) e PDH.

La glicolisi è ora più attiva per la doppia disinibizione (da ATP e P-creatina) e produce, inizialmente per via anaerobia, l'ATP richiesto in più per sostenere il ritmo di contrazioni richiesto dalla accelerazione.

Se il ritmo accelerato di corsa viene mantenuto nel tempo per circa 10-15 min, l'organismo e la fibra possono adattarsi al metabolismo ossidativo (incremento del battito cardiaco e quindi incremento nel trasporto di O₂, glucosio ed acidi grassi, vasodilatazione nei distretti che irrorano le fibre in contrazione, ecc.).

Le fibre di tipo I hanno una riserva propria di trigliceridi che quantitativamente ha un valore scarso se confrontata con la richiesta di acidi grassi durante uno sforzo prolungato come la maratona. Gli acidi grassi aumentano in concentrazione nel sangue lentamente, e lentamente diffondono dal sangue, ed il loro adattamento è più lento di quello dell'O₂. Quindi la riserva di trigliceridi della fibra può favorire un più rapido adattamento verso una maggiore utilizzazione degli acidi grassi, prima dell'incremento di flusso di acidi grassi dal sangue verso le fibre. Gli acidi grassi endogeni possono essere liberati direttamente nel sarcoplasma ed essere β -ossidati senza la latenza dovuta alla lenta diffusione dal sangue al sarcoplasma. Il loro contributo può essere al massimo il 10% di quello degli acidi grassi provenienti dal sangue. Quando l'apporto di acidi grassi esogeni diviene sufficiente a sostenere la β -ossidazione delle fibre, la degradazione dei

triglicerici endogeni rallenta ed in relazione alla frequenza di contrazione si può avere nella fibra risintesi dei triglicerici.

Tutti questi meccanismi di adattamento favoriscono il metabolismo aerobico e la di glicolisi anaerobica (causata dall'accelerazione) viene fortemente ridotta perchè ora il piruvato prodotto entra nel ciclo di Krebs piuttosto che essere convertito a lattato. Quindi si ha una maggiore produzione di moli di ATP/mole di glucosio, inoltre viene aumentata anche l'utilizzazione degli acidi grassi. Tutto ciò porta alla riduzione progressiva della glicolisi con la seguente evoluzione temporale: inizialmente, con la sostituzione della glicolisi anaerobia, con la più efficiente glicolisi anaerobia, parte dell'ATP viene anche utilizzato per rigenerare la P-creatina. L'incremento della C_{ss}-P-creatina causa la prima riduzione della glicolisi per inibizione della FFC e PC. L'incremento di efficienza nella produzione di ATP per incremento del metabolismo aerobico, appena la C_{ss}-P-creatina è tornata a livelli vicini a quelli di riposo, causa un incremento della C_{ss}-ATP e quindi un rallentamento della glicolisi per effetto sugli stessi enzimi (FFC e PC); l'incremento nell'utilizzazione degli acidi grassi porta anch'esso alla riduzione della glicolisi mediante l'azione inibitoria del citrato sulla FFC.

Se durante la corsa aerobia viene compiuta una accelerazione tale che le fibre I non possono sostenere anche con la loro attività anaerobica, intervengono le fibre IIA e se necessario le IIB, più potenti delle fibre I a sostenere maggiore sforzo. Se il ritmo di corsa viene mantenuto, le fibre si adatteranno a sostenerlo (come visto sopra), se ciò è al di sopra delle loro possibilità aerobiche, rimarranno in funzione le fibre IIA e le IIB.

Le fibre che si contraggono liberano Ca^{2+} dal reticolo sarcoplasmatico (forma specializzata del reticolo endoplasmatico) nel sarcoplasma (citoplasma).

Il Ca^{2+} attiva la glicogeno fosforilasi-b-cinasi (non fosforilata e fosforilata), e tramite questa la glicogeno fosforilasi, che provoca la glicogenolisi nella fibra stessa che si contrae (fig. 7-9). Questa azione risulta molto utile nelle fibre di tipo I all'inizio della contrazione per alimentare la glicolisi anaerobica.

Il Ca^{2+} attiva anche l'enzima piruvato deidrogenasi (fig. 7-9); questo effetto è importante perchè si oppone all'azione del NADH e dell'acetil-CoA che inibiscono l'enzima. Se l'enzima PDH fosse anche completamente inibito, il glucosio ematico non potrebbe essere ossidato a CO_2 ed H_2O e subirebbe solo la glicolisi anaerobica.

In relazione alla velocità di contrazione, le fibre I possono importare acido lattico prodotto da fibre vicine di tipo II. Tuttavia, quando la frequenza delle contrazioni è tale che la sintesi aerobica di ATP è insufficiente (es. accelerazione), anche le fibre di tipo I attivano la glicolisi anaerobica e quindi esportano acido lattico.

Altri effetti importanti per la regolazione del metabolismo durante le contrazioni delle fibre I, sono quelli dati dalla ammoniaca e dall'AMP sulla fosfofruttocinasi. Sebbene nelle contrazioni di regime la C_{ss}-AMP aumenti poco, essa rimane un importante segnale di carenza di ATP. Infatti, l'AMP è

capace di attivare FFC e di rimuovere l'inibizione dell'ATP e del citrato su lo stesso enzima. Questo secondo effetto è importante perchè, anche durante le contrazioni la, C_{ss}-ATP rimane relativamente alta (più alta della C_{ss}-AMP) e l'effetto del AMP permette di attivare l'enzima rendendolo insensibile agli inibitori (fig.7-1). L'AMP si forma da ADP con la reazione adenilico cinasica (AdC) e l'ammoniaca delle reazioni AMP-deaminasi e adenosina-deaminasi.

Queste reazioni portano ad una piccola riduzione della concentrazione totale dei nucleotidi adenilici. La reazione adenilico cinasica è all'equilibrio, per cui quando si ha una variazione nella C_{ss}-ATP, si ha della C_{ss}-ADP ed anche della C_{ss}-AMP.

L'AMP è anche convertito in IMP e NH₃ con la reazione AMP deaminasi, ed in adenosina nella reazione 5'nucleotidasi. L'adenosina è convertita in inosina e NH₃ nella reazione adenosina deaminasi. L'adenosina ha l'importante funzione di stimolare la vasodilatazione dei capillari che irrorano la fibra che si contrae. L'adenosina può essere prodotta, oltre che dal pool dei nucleotidi adenilici liberi, anche da nucleotidi adenilici provenienti da acidi nucleici (mRNA, tRNA e rRNA) che possono essere degradati nella fibra che si contrae specialmente se lontano dai pasti. Ugualmente da questi nucleotidi può essere prodotta altra NH₃.

La NH₃ in eccesso può essere combinata con il piruvato (via le reazioni GDH e GPT) ed allontanata dalla fibre come alanina, che nel fegato viene riconvertita in glucosio, ed il glucosio rimesso in circolo. Anche il lattato eventualmente prodotto segue lo stesso destino. Il ciclo lattato-glucosio fra tessuto muscolare e fegato è detto ciclo di Cori.

Negli sforzi prolungati che sono sostenuti prevalentemente dalle fibre di tipo I, la fatica insorge per esaurimento delle riserve glucidiche che portano ad un rallentamento della glicolisi. Le fibre di tipo I sintetizzano l'ATP necessario alla loro contrazione utilizzando contemporaneamente glucosio ematico, glicogeno ed acidi grassi (fig. 7-24). Il glucosio ematico proviene principalmente dal glicogeno epatico e gli acidi grassi dal tessuto adiposo.

Il glicogeno epatico ed il glicogeno della fibra che si contrae sono riserve energetiche quantitativamente molto inferiori alla riserva energetica costituita dai trigliceridi del tessuto adiposo. Da ciò risulta che durante gli sforzi prolungati si esauriscono prima le riserve glucidiche di quelle lipidiche. Si assume che per primo si esaurisca il glicogeno epatico e poi il glicogeno delle fibre che si contraggono.

Esaurite le riserve glucidiche, gli acidi grassi non sono in grado di sostituire totalmente il glucosio nella sintesi di ATP (forse per la loro lenta diffusione dal sangue al sarcoplasma), il glucosio prodotto con il ciclo di Cori è insufficiente, per cui, la fibra, producendo meno ATP nell'unità di tempo, è costretta a contrarsi più lentamente. Lo stato e la sensazione di ridotta potenza muscolare sono detti fatica.

La glicemia è mantenuta entro livelli normali dal fegato mediante la gluconeogenesi da acido lattico (ciclo di Cori),

da alanina e da altri aminoacidi liberati dal tessuto muscolare e dal fegato stesso.

Il mantenimento della glicemia è importante per non pregiudicare la funzione dei globuli rossi e soprattutto delle cellule del sistema nervoso. I globuli rossi (anaerobiosi obbligati) e le cellule nervose (in condizioni di sforzo prolungato) producono ATP solo da glucosio. Le cellule nervose ogni minuto utilizzano complessivamente circa 470 μmol i e gli eritrociti circa 25 μmol i. Si assume che la gluconeogenesi epatica sia capace di produrre ogni minuto circa 500 μmol i (2,8 mg), ma non può produrre le circa 15 mmoli di glucosio al minuto richieste per produrre circa il 50% di ATP, che insieme all'altro 50% di ATP prodotto dagli acidi grassi sostiene la corsa aerobica di un atleta campione di maratona. Gli atleti allenati su lunghe distanze possono sostenere aerobicamente corse a circa 20 Km/h. Tuttavia, pur non varcando la soglia aerobica, producono una piccola quantità di acido lattico che aumenta in relazione diretta con la velocità della corsa (corse sostenute in aerobiosi a velocità progressivamente più alte per lunghi tratti, non accelerazioni, fig. 7-25).

La spiegazione data è la stessa che è stata data per le fibre in riposo (fig. 7-20). Il piruvato prodotto con la glicolisi, anche in condizioni aerobiche, è rapidamente convertito in lattato (via reazione LDH); il lattato nel citoplasma è in equilibrio con il lattato nel sangue, e nel sangue il lattato viene continuamente assunto dal fegato. Quindi c'è una continua deriva di piruvato verso il lattato ematico, anche se in condizioni di aerobiosi la maggior parte del piruvato viene trasformata in acetil CoA. Questa piccola perdita di energia è ripagata dal fatto che, quando necessario, la fibra può autoregolarsi a produrre ATP anaerobicamente. Se le fibre I si contraggono anaerobicamente per deficit di O_2 (inizio delle contrazioni, contrazioni isometriche, apnea), le fibre I possono andare in fatica, per acidificazione della fibra causata da acido lattico, con lo stesso meccanismo delle fibre IIB (questa figura b).

Fibre di tipo IIA.

La regolazione di queste fibre ha le caratteristiche generali di quelle di tipo I con alcune differenze che sono in relazione alla maggiore velocità di contrazione e di conseguenza della maggiore velocità di sintesi di ATP.

Si ritiene che con l'allenamento (es. corse su lunghe distanze "lente"), le fibre IIB possano differenziarsi a sintetizzare ATP aerobicamente, cioè ad assumere caratteristiche biochimiche delle fibre IIA.

Le fibre IIA hanno un patrimonio enzimatico che conferisce loro un'alta capacità glicolitica associata ad un'alta capacità ossidativa. Questo patrimonio permette di utilizzare, rispetto alle fibre I, una maggiore quantità di glucosio (ematico) e di glicogeno, e circa la stessa quantità di acidi grassi. Da ciò scaturisce la maggiore capacità di sintesi di ATP nell'unità di tempo che hanno le fibre IIA rispetto alle fibre I, e quindi la loro maggiore velocità di contrazione in condizioni aerobie (fig. 7-19). La maggiore utilizzazione del glicogeno rende queste fibre più potenti ma meno resistenti alla fatica. Come visto per le fibre I (fig. 7-19, 7-21 e sommario 1), anche le fibre IIA all'inizio delle contrazioni, durante le contrazioni isometriche e durante le accelerazioni, producono ATP anaerobiamente, ed essendo dotate di una maggiore attività massima glicolitica, possono contrarsi più velocemente delle fibre I, anche in condizioni di deficit di O_2 .

Le fibre di tipo IIA opereranno gli stessi adattamenti descritti per le fibre di tipo I: reazione adenilato ciclasica (recuperare di ATP da ADP e sintesi di AMP, effettore positivo di FFC e glicogeno-fosforilasi-b), sintesi di IMP (effettore positivo di glicogeno-sintetasi-b) sintesi adenosina (vasodilatatore locale), produzione di P_i (effettore positivo di FFC e glicogeno-fosforilasi-b), produzione di NH_3 (effettore positivo di FFC), eliminazione dell'eccesso di NH_3 come alanina (eliminata dalla fibra e riconvertita in glucosio nel fegato), ciclo di Cori per eliminare l'acido lattico e riavere glucosio.

Si assume che per le fibre IIA, lo stato di fatica avvenga in conseguenza delle stesse cause indicate per le fibre di tipo I: per esaurimento delle riserve glucidiche (se si contraggono aerobiamente); e come per le fibre di tipo IIB: acidificazione delle fibre (se si contraggono anaerobiamente, vedere questa figura b).

b) Fibre di tipo IIB.

Queste fibre sono costruite per contrazioni rapide e conseguentemente di breve durata, circa 40s se si contraggono al massimo della loro velocità. Gli enzimi di queste fibre hanno la stessa regolazione da effettore delle fibre I e IIA.

Alcuni effetti non sono indicati nello schema perchè ritenuti di scarsa entità e non determinanti per la regolazione delle fibre IIB in contrazione. Ad esempio l'inibizione della P-creatina su FFC e PC, dato il forte abbassamento della C_{ss}-P-creatina che avviene nella contrazione rapida (fig. 7-24a). Anche l'inibizione del citrato sulla FFC si assume essere non significativa data la bassa C_{ss}-citrato.

L'ATP necessario per queste contrazioni è sintetizzato per più del 99% con la glicolisi anaerobia ed il glucosio-6P utilizzato, proviene quasi esclusivamente dal glicogeno della fibra che si contrae. Il glicogeno è anche energeticamente più produttivo (3 ATP/unità di glucosio) del glucosio libero (2 ATP/molecola di glucosio).

Queste fibre sono specializzate per fornire rapidamente grosse quantità di ATP per via anaerobia, che si assume sia obbligatoria data la scarsa capacità ossidativa delle fibre, dimostrata dal loro scarso patrimonio di mitocondri.

Nelle fibre IIB lo spazio lasciato libero dai mitocondri è occupato da miofibrille, e quindi la fibra IIB è adattata a produrre una maggiore quantità di lavoro nell'unità di tempo.

Le fibre IIB, indipendentemente dalla durata e velocità di contrazione, producono ATP anaerobiamente, utilizzando P-creatina e glicogeno. Solo in condizioni di riposo le fibre IIB producono ATP aerobiamente, si assume che nella contrazione questa bassa attività sia subito inibita da NADH che si accumula rapidamente all'inizio delle contrazioni. La regolazione del sistema GLI-CIK-PO delle fibre IIB, è a quella che si verifica agli inizi delle contrazioni nelle fibre I e IIA.

Nelle corse veloci il consumo di ATP è circa 3 $\mu\text{mol/g}$ T.F. (fig. 7-19).

Nei muscoli in contrazione rapida la P-creatina passa dalla concentrazione di riposo 17 $\mu\text{mol/g}$ T.F. a circa 4 $\mu\text{mol/g}$ T.F. Quindi 13 μmol di P-creatina sono sufficienti per sostenere circa 4 secondi di contrazioni rapide di atleti campioni di corsa veloce e corrispondono a circa 40 m di corsa. La P-creatina rigenera l'ATP utilizzato nelle prime contrazioni. L'ATP diminuisce in concentrazione ma meno drammaticamente (da 4,6 a 3,7 $\mu\text{mol/g}$ di tessuto) della P-creatina. Sebbene la C_{ss}-ATP sia diminuita, essa è più che sufficiente per saturare la ATPasi delle miofibrille che possono utilizzare ATP e contrarsi al massimo.

La riduzione della C_{ss}-P-creatina prima, e della C_{ss}-ATP subito dopo, sono importanti segnali di regolazione perchè vengono rimosse le inibizioni dei due metaboliti sugli enzimi glicogeno-fosforilasi b, fosfofruttocinasi e piruvato cinasi. Si attiva così la glicogenolisi e glicolisi, che divengono il sistema che alimenta la produzione di ATP sostituendosi alla P-creatina perchè ormai troppo bassa in concentrazione evitando così un ulteriore calo della

Css-ATP. Il piruvato viene eliminato come lattato al fine di riossidare continuamente ed anaerobiamente NAD^+ che è ridotto nella reazione gliceraldeide-deidrogenasi. Questa reazione, se non fosse accoppiata alla reazione lattico deidrogenasica, si arresterebbe in tempi brevissimi per mancanza di NAD^+ , dato che la quantità di nucleotidi nicotinici nel citoplasma è molto limitata. Data la brevità delle contrazioni (massimo 20 s in atleti campioni), l'acido lattico prodotto è riconvertito in glucosio (ciclo di Cori) durante il riposo. Ugualmente, le di Css di altri metaboliti ed ioni modificate dalle contrazioni ritornano a valori normali con il riposo (fig. 7-23).

L'utilizzazione del glucosio ematico e la produzione di ATP mediante P-ossidativa, sono molto scarse durante la contrazione delle fibre IIB, si assume che per ambedue siano inferiori dell'1% e forse assenti.

Durante la contrazione tutti gli intermedi della glicolisi aumentano in concentrazione, per cui il G6P inibisce l'esocinasi rendendo ancora più esigua la quantità di glucosio ematico che partecipa alla glicolisi. L'effetto inibitorio del G6P sulla glicogeno fosforilasi è antagonizzato da quelli positivi del Ca^{2+} , AMP, IMP e Pi. Rispetto al riposo la Css-ADP e Css-AMP variano poco, mentre la Css-IMP aumenta dell'80% e quella del Pi del 126%. Quindi questi due effettori devono svolgere un ruolo importante. Sebbene la Css-AMP aumenti poco, l'azione di questo effettore è importante perchè oltre ad attivare l'enzima FFC lo rende meno sensibile all'inibizione dell'ATP (vedere sopra fibre I e fig. 7-1).

La fosfofruttocinasi è attivata da F6P e F1,6diP. L'attivazione da F6P è spiegata come un meccanismo per coordinare l'attività della fosfofruttocinasi con la produzione di G6P prodotto dal catabolismo del glicogeno stimolato da Ca^{2+} . Il Ca^{2+} è liberato nel sarcoplasma durante la contrazione della fibra stessa. L'attivazione da F1,6diP ha la funzione di promuovere un ulteriore incremento della concentrazione di questo stesso metabolita quando la reazione 3P-gliceraldeide deidrogenasica è rallentata da un abbassamento della Css- NAD^+ . Poichè le reazioni a monte della 3P-gliceraldeide deidrogenasi sono all'equilibrio, un rallentamento di detta reazione porta ad un accumulo di F1,6diP. Il F1,6diP stimolando la fosfofruttocinasi favorisce un suo ulteriore incremento che si oppone al rallentamento della 3P-gliceraldeide deidrogenasi. Inoltre, una alta Css-F1,6diP incrementa la velocità della glicolisi a valle della reazione 3-PGal-DH mediante l'azione di attivazione del F1,6diP sull'enzima PC. La reazione piruvato cinasica potrebbe essere rallentata dall'aumento di Css-piruvato che si ha in anaerobiosi. Tuttavia il piruvato è continuamente convertito a lattato dalla reazione LDH che è all'equilibrio, ed è spinta verso il lattato dall'alta Css-NADH. Il piruvato è anche convertito in alanina mediante la reazione piruvato-glutamato transaminasi ed eliminato dalla fibra.

Tutti questi effetti hanno la funzione di attivare al massimo la glicolisi coordinando le sue reazioni con la velocità della reazione FFCca, che risulta essere attiva al suo massimo.

Le fibre di tipo IIB possono produrre una grande quantità di ATP, nell'unità di tempo, circa 5 volte di più delle fibre di tipo I. Tuttavia, le fibre IIB vanno rapidamente in fatica, cioè sono inabili a mantenere nel tempo la loro alta capacità di lavoro (fig. 7-24a). Ciò è causato dall'esaurirsi delle limitate riserve di P-creatina, ma soprattutto per un rapido accumulo di protoni prodotti dalla dissociazione all'interno della fibra stessa dell'acido lattico prodotto dalla glicolisi anaerobia. Infatti la fatica inizia dopo che la C_{ss}-P-creatina si è molto abbassata e non può più rigenerare ATP (circa 4s), e prima che la riserva del glicogeno nella fibra sia completamente esaurita, cioè dopo circa 20 secondi di contrazioni veloci anaerobiche di atleti campioni di corsa veloce. I protoni (non l'acido lattico) sono responsabili della fatica, perchè il muscolo continua a contrarsi in presenza di alte concentrazioni di acido lattico se il pH intramuscolare è mantenuto vicino a 7. Durante la contrazione anaerobia il pH del muscolo scende da 7 a 6,5 + 6,4 ed il pH del sangue da 7,4 a 6,8 + 6,9. I protoni interferiscono nel meccanismo del rilascio del Ca²⁺ nel sarcoplasma, per cui la stessa stimolazione nervosa delle fibre è meno efficace; inoltre gli H⁺ interferiscono sull'attività del complesso actina-miosina riducendo l'attività ATPasica e quindi la capacità di contrazione. La P-creatina produce ATP, da ADP senza produrre protoni, tuttavia è una riserva limitata nella quantità, forma 1 sola molecola di ATP per ogni molecola di P-creatina. Il glicogeno è una riserva quantitativamente maggiore della P-creatina, produce 3 molecole di ATP per ogni unità di glucosio del glicogeno, tuttavia la sua utilizzazione è limitata dalla produzione dei protoni.

Considerazioni sulla contrazione dei tre tipi di fibre.

Se le contrazioni dei muscoli scheletrici sono precedute da stati di stress, si ha la liberazione di catecolamine (fig. 7-11c) che predispongono le fibre ad una pronta e sostenuta contrazione (si definisce genericamente come preparazione all'attacco ed alla fuga). L'adrenalina ha per i recettori β_2 adrenergici 10 volte più affinità della nor-adrenalina, per cui si assume che sia la componente più attiva delle catecolamine.

La secrezione di catecolamine, precedente alla contrazione muscolare, appare inevitabile nello sport anche per i campioni, a causa degli eventi che precedono la gara e che scandiscono l'avvicinarsi dell'evento (entrata nel campo di gara, appello, ecc.).

Nelle gare sportive che richiedono attività prolungate nel tempo (es. maratona, circa 2 h), si ha liberazione di catecolamine anche durante la corsa (correre sulle lunghe distanze causa stress). La C_{ss}-adrenalina del sangue raddoppia dopo 40 minuti di corsa. Negli sforzi prolungati, dopo 40 min. e prima delle 2 h, viene secreto anche il glucagone in conseguenza dell'abbassamento della glicemia (fig. 7-24b).

Le catecolamine fanno aumentare la C_{ss}-glucosio e la C_{ss}-acidi grassi nel sangue mediante la loro azione sul fegato e tessuto adiposo (fig. 7-11c) e nelle fibre muscolari stimolano la glicogenolisi stimolando la

conversione della fosforilasi-b in fosforilasi-a (attiva) e la glicolisi per attivazione delle FFC mediante il F2,6diP (fig. 7-9).

Gli effetti delle catecolamine sul sistema circolatorio favoriscono una maggiore distribuzione di O₂, glucosio ed acidi grassi alle fibre. Le catecolamine inibiscono l'entrata del glucosio nelle fibre muscolari. Si ritiene che questo effetto apparentemente contraddittorio, sia ristretto al periodo di preparazione alla contrazione, ed a quello immediatamente seguente delle prime contrazioni. L'inizio delle contrazioni è anaerobio e le fibre muscolari per produrre ATP utilizzano solo la propria riserva di glicogeno e non glucosio ematico.

Successivamente ci può essere l'adattamento dei recettori all'azione delle catecolamine, cioè una riduzione della sensibilità dei recettori all'azione delle catecolamine (fig. 7-10).

Riassumendo: le catecolamine hanno un effetto preparatorio immediato sulle fibre muscolari di tutti i tipi dove stimolano la degradazione del glicogeno contenuto nelle fibre stesse ed evitano l'entrata nelle fibre del glucosio ematico che potrebbe favorire la conversione della fosforilasi a nella forma b (meno attiva) (fig. 7-9). Un effetto ugualmente rapido si ha sul sistema circolatorio, che incrementa la sua attività, sul fegato, che libera glucosio per degradazione della sua riserva di glicogeno, e sul tessuto adiposo, che libera glicerolo ed acidi grassi per attivazione delle lipasi (fig. 7-9).

Degli effetti delle catecolamine sul sistema circolatorio, fegato e tessuto adiposo, le fibre che si contraggono traggono beneficio 10-15 minuti dopo l'inizio delle contrazioni, perchè questo è il tempo necessario per portare la circolazione del sangue a ritmi tali da consentire il trasporto di O₂ sufficiente a permettere la produzione aerobia di ATP.

Le fibre IIB, anche se impegnate nella contrazione, non beneficiano degli effetti di un maggiore trasporto di O₂ e di glucosio, perchè essendo anaerobie obbligate utilizzano solo le proprie riserve di P-creatina e glicogeno. L'azione delle catecolamine, tendendo a rimuovere le cause responsabili del metabolismo anaerobio delle contrazioni iniziali (insufficiente battito e gittata cardiaca, insufficiente apporto di O₂, glucosio ed acidi grassi), riducono i tempi di durata delle contrazioni anaerobie iniziali e portano ad un più rapido inizio del regime aerobio di produzione di ATP nelle fibre di tipo I e IIA. Se dopo un inizio più o meno veloce, l'atleta svolge esercizi "lenti" (es. corsa per la maratona), la preparazione alla produzione aerobia dell'ATP, operata dalle catecolamine, trova la sua utilizzazione dopo 10-15 min. Se invece l'atleta svolge esercizi veloci (es. corsa veloce di 100-200 m), la preparazione suddetta verrà utilizzata forse pochissimo nelle fasi finali della corsa e sicuramente al termine della corsa (al massimo dopo 20s), per rimuovere velocemente acido lattico e protoni dalla fibre e rigenerare P-creatina e glicogeno (fig. 7-23, 7-24).

Le catecolamine hanno anche un altro effetto preparatorio

su i tre tipi di fibra: favorendo la conversione dell'enzima glicogeno-fosforilasi cinasi nella sua forma attiva, rendono l'enzima più sensibile all'azione degli ioni Ca^{2+} , per cui la fibra che è stata attivata dall'adrenalina sarà stimolata dal Ca^{2+} più di quella che non ha subito l'effetto dell'ormone. Infatti il Ca^{2+} stimola ambedue le forme della glicogeno-fosforilasi cinasi, ma l'effetto è maggiore per la forma fosforilata, cioè quella più attiva. Questa azione del Ca^{2+} è importante perchè rende l'azione glicogenolitica dell'adrenalina da generale (su tutte le fibre, sia che si contraggano o no) a specifica (solo nelle fibre che si contraggono, cioè quelle in cui viene liberato il Ca^{2+} nel sarcoplasma). In seguito, anche se i livelli di adrenalina decrescono, il Ca^{2+} può continuare la sua azione di attivazione.

La fosforilasi-b cinasi è sensibile al Ca^{2+} per azione della sua subunità δ che è la calmodulina. La calmodulina è una proteina che associa il Ca^{2+} con alta affinità, attiva molti enzimi ed è presente in quasi tutte le cellule. Quando la calmodulina, associata alla proteina fosforilasi-b, associa il Ca^{2+} aumentato in concentrazione nel sarcoplasma, cambia conformazione ed attiva l'enzima.

La glicogeno fosforilasi nella sua forma attiva (a) (non nella forma b) è insensibile agli effettori cellulari (G6P, AMP, IMP, Pi), per cui essa risulta attiva anche se le concentrazioni degli effettori stessi possono oscillare. Con l'azione preparatoria delle catecolamine, la fosforilasi è convertita nella forma a e quindi è attivata già prima che le Css degli effettori raggiungano le concentrazioni sufficienti ad influenzare la glicogeno-fosforilasi b.

Il Ca^{2+} è attivo anche sulla glicogeno-fosforilasi-b cinasi non fosforilata, quindi lo ione può esercitare la sua azione glicogenolitica anche se non c'è stata una azione preparatoria da parte delle catecolamine, o se i loro effetti si sono esauriti. Se l'azione del Ca^{2+} sulla fosforilasi-b cinasi precede quella delle catecolamine, si ha egualmente l'incremento di attività osservato quando le due azioni avvengano in ordine inverso.

FIBRE MUSCOLARI I e II A in contrazione

Fig. 7-22 (a)

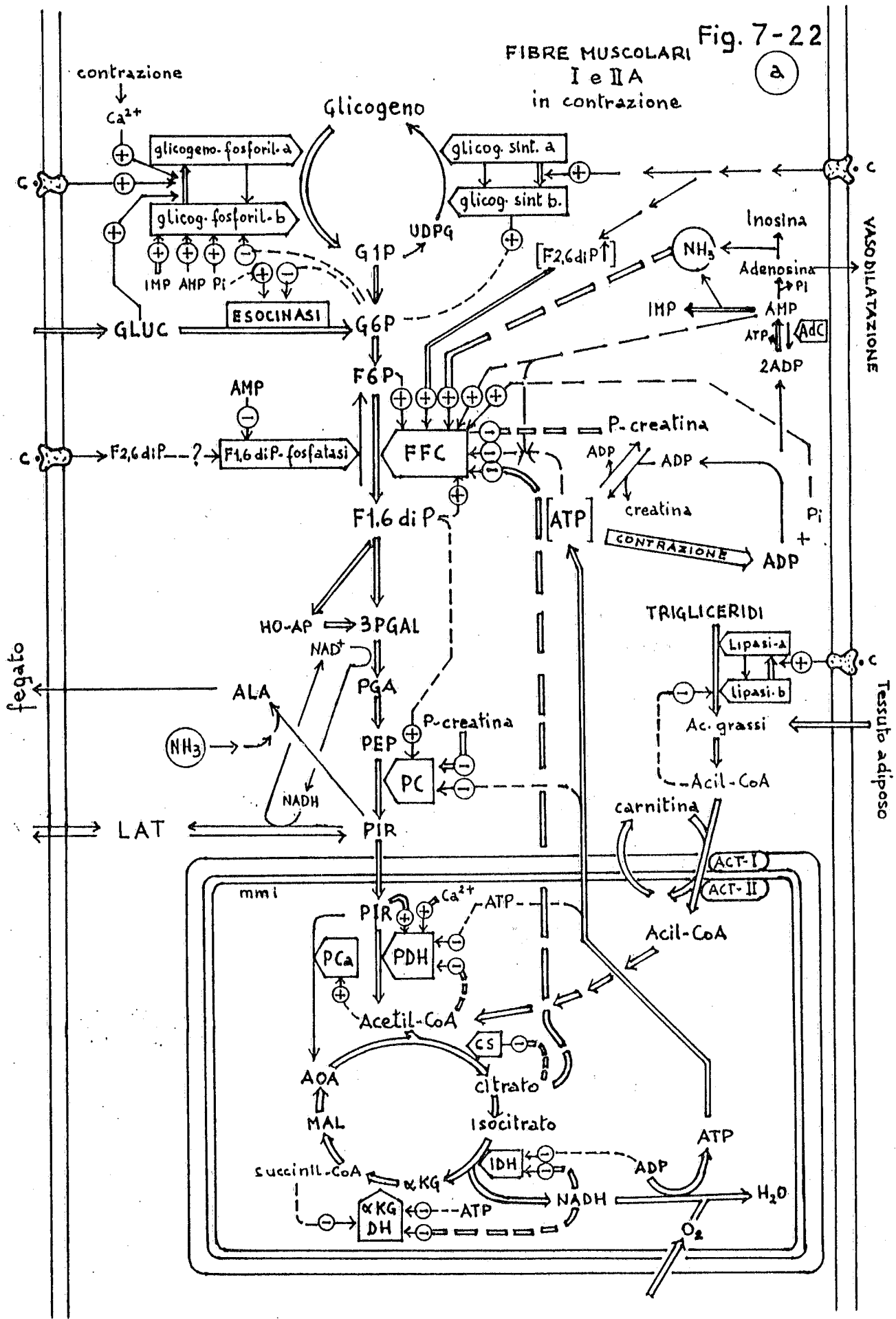
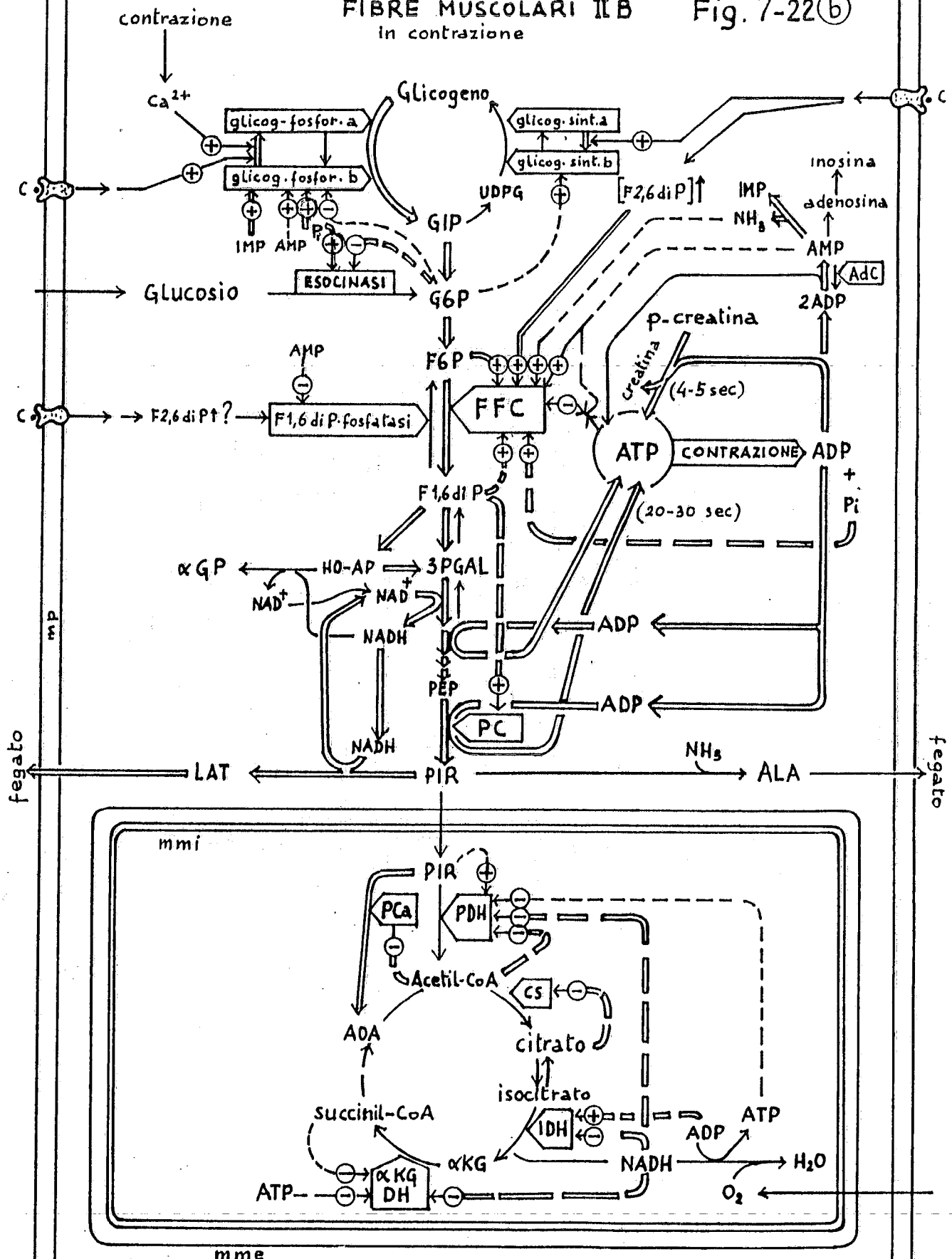


Fig. 7-22(b)



Sommario 1 (figg. 7-19, 7-20, 7-21, 7-22).

Evoluzione del metabolismo energetico delle fibre muscolari dallo stato di riposo all'inizio delle contrazioni.

Le fibre muscolari (I, IIA, IIB) in riposo sintetizzano ATP aerobicamente utilizzando prevalentemente >90% di acidi grassi. Quando iniziano a contrarsi, anche lentamente, le fibre muscolari cambiano repentinamente metabolismo. Per i primi secondi, sintetizzano ATP anaerobiamente da P-creatina, e successivamente da glicogeno, ambedue presenti nelle fibre stesse. L'attivazione della glicogenolisi e glicolisi è per disinibizione della glicogeno-fosforilasi-b, FFC e PC in conseguenza della riduzione della C_{ss}-P-creatina (disinibizione di FFC e PC) e della C_{ss}-ATP (disinibizione di G6P e AMP sulla glicogeno-fosforilasi-b, e direttamente sulla FFC e PC). Lo schema di questa regolazione è identico a quello delle fibre IIB in contrazione (fig. 7-22b) che sono specializzate per le contrazioni rapide e sintetizzano ATP sempre anaerobiamente, sia all'inizio che durante le loro contrazioni di regime, perché dotate di scarso patrimonio enzimatico per il metabolismo ossidativo. Nel passaggio da riposo a contrazione, la sintesi anaerobia dell'ATP è imposta anche alle fibre I e IIA dal deficit di O₂ in relazione all'aumentato consumo di ATP (70÷300 volte maggiore rispetto al riposo) causato dalle prime contrazioni. La durata della fase anaerobia è in relazione all'allenamento del muscolo (più allenato-fase più breve) e dalla velocità delle prime contrazioni (più lente-fase più breve).

I muscoli umani sono composti da almeno tre tipi di fibra (I, IIA, IIB) innervate da motoneuroni diversi. Ogni motoneurone innerva più di una fibra (neurone + fibre = unità motoria), ma tutte dello stesso tipo. Un muscolo che inizia a contrarsi lentamente riceverà impulsi nervosi che stimoleranno prevalentemente le sue fibre di tipo I, se invece le contrazioni utili in quel momento sono rapide, verranno stimulate prevalentemente le fibre di tipo IIA e IIB. Se le contrazioni, pur essendo lente, richiedono molta energia che non può essere sostenuta dalle sole fibre I del muscolo, verranno stimulate a contrarsi tutti i tipi di fibra e prevalentemente le fibre IIB.

Le fibre I sono dotate di un alto contenuto di P-creatina-cinasi (solo 20% inferiore a quello delle fibre II), e ciò conferma che queste fibre, sebbene dotate di alta capacità di sintesi aerobia di ATP, hanno la capacità di contrarsi sintetizzando ATP anaerobiamente. Questa necessità si verifica all'inizio delle contrazioni, nelle accelerazioni del ritmo di contrazione aerobia (fig. 7-22a) e nelle contrazioni isometriche (contrazione senza riduzione della lunghezza del muscolo, come per sostenere un peso). Il cambiamento del metabolismo nel passaggio dallo stato di riposo a quello di contrazione può avvenire con tre modalità:

a) Contrazione isometrica. Questa contrazione è sostenuta da ATP prodotto solo anaerobiamente da glicogeno, perché nel muscolo contratto i capillari vengono compressi impedendo la circolazione del sangue e quindi l'apporto di O₂ e di

glucosio. L'ossigeno legato alla Mb è sufficiente per pochi secondi. Il numero ed il tipo di fibra coinvolto dipende dal peso da sostenere. Con scarso peso prevalgono fibre di tipo I, con l'incremento del peso saranno reclutate fibre di tipo IIA e poi IIB perchè capaci di sintetizzare più ATP nell'unità di tempo.

b) Contrazioni lente. Se il muscolo inizia a contrarsi lentamente, le contrazioni sono sostenute prevalentemente dalle fibre I ed in relazione alla velocità di contrazione anche da fibre IIA, che produrranno ATP anaerobicamente. Continuando a contrarsi con la stessa frequenza, in circa 10-15 min le fibre I cambieranno metabolismo nuovamente, produrranno ATP aerobicamente utilizzando circa il 50% di acidi grassi, e per il rimanente 50% glicogeno della fibra e glucosio ematico (fig. 7-22a). Con questo tipo di metabolismo le fibre di tipo I possono contrarsi per molte ore (negli atleti campioni di maratona circa 2 h al massimo delle loro capacità aerobie (circa 20 Km/h) e fino a 12 h con velocità inferiori a 20 Km/h.

c) Contrazioni veloci. Quando il muscolo inizia a contrarsi molto velocemente, le contrazioni sono sostenute dalle fibre IIB che sono dotate, rispetto alle altre, della più alta capacità di sintesi di ATP. Anche in queste condizioni la sintesi di ATP avviene anaerobicamente e non cambia nel tempo perchè le fibre IIB sono anaerobie obbligate (fig. 7-19). Tuttavia le contrazioni rapide massime possono durare solo poco più di 20 s (fig. 7-22b).

Si ritiene che le fibre IIA intervengano nelle contrazioni con velocità intermedie tra veloci e lente. Le corse su lunghe distanze (es. maratona) sono sostenute da sintesi aerobia di ATP (fig. 7-22a), se durante queste corse viene fatta una accelerazione, questa viene sostenuta da sintesi anaerobia di ATP da P-creatina o da glicolisi anaerobia del glicogeno della fibra stessa (fig. 7-22a). Infatti, il metabolismo per la sintesi di ATP durante le accelerazioni della corsa, somiglia a quello descritto sopra per l'inizio delle contrazioni. L'ATP richiesto in più dalle fibre per poter aumentare la loro frequenza di contrazione, non può essere prodotto aerobicamente perchè l'apporto di O₂ del momento, che era sufficiente a sostenere la sintesi di ATP per la corsa prima dell'accelerazione, è ora insufficiente. Solo se l'atleta mantiene la corsa accelerata per circa 10 min, l'apporto di O₂ (cioè respirazione, circolazione del sangue e vasodilatazione locale) sarà aggiustato in modo da sostenere la sintesi aerobia di ATP (vedere fig. 7-22a). La sintesi anaerobia dell'ATP può essere sostenuta anaerobicamente dalle fibre I stesse, altrimenti, in relazione alla velocità di contrazione e quindi in relazione diretta alla velocità di sintesi di ATP richiesta per sostenere lo sforzo, intervengono anaerobicamente prima le fibre IIA e poi le fibre IIB.

Sommario 2 (figg. 7-19, 7-20, 7-21, 7-22).

Considerazioni generali sulla regolazione delle fibre muscolari in contrazione.

Sommario.

I tre tipi di fibre hanno la regolazione della glicolisi-ciclo di Krebs e P-ossidativa molto simile in almeno tre condizioni:

a) A riposo. Le fibre hanno un metabolismo energetico aerobio ed utilizzano quasi esclusivamente acidi grassi (90%). Durante il digiuno, parte degli acidi grassi è sostituita dai corpi chetonici in proporzioni che dipendono dalle C_{ss} relative di acidi grassi e corpi chetonici nel sangue. Il glucosio ematico è utilizzato pochissimo in quantità inferiore al 10%, forse in proporzione maggiore nelle fibre di tipo IIB rispetto alle fibre di tipo I.

b) Contrazioni isometriche. Il muscolo si contrae non compiendo movimenti, comprime i capillari non permettendo la circolazione del sangue, rendendo le fibre prive di apporto di O₂ e glucosio per tutta la durata della contrazione. L'ATP può essere prodotto solo anaerobiamente utilizzando P-creatina e glicogeno della fibra stessa che si contrae, con produzione di acido lattico. Si ritiene che il reclutamento del numero e tipo di fibra dipenda dal lavoro fatto dal muscolo. Maggior lavoro, più fibre e prevalentemente di tipo IIB relativamente a fibre di tipo IIA ed I.

c) Le contrazioni iniziali. Le fibre producono ATP anaerobiamente utilizzando P-creatina e glicogeno, liberano acido lattico. Questo avviene perché l'apporto di O₂ e glucosio è insufficiente nei primi 5-10 minuti per produrre aerobiamente gli ATP richiesti. Il tempo di adattamento dipende dagli individui, dall'allenamento, dal tipo di fibra e dalla velocità di contrazione. Per ridurre questa fase, gli atleti compiono movimenti lenti e veloci (detti riscaldamento). Se la corsa è di tipo lento (esempio maratona), alcuni atleti compiono scatti veloci in modo da impegnare le fibre veloci che si impoveriranno di glicogeno, ma saranno usate poco durante la corsa. Mentre sarà accelerata la circolazione del sangue in modo che, al momento della partenza, l'atleta si troverà già "avviato" per contrarre aerobiamente i muscoli.

Se la contrazione iniziale è attuata al massimo di velocità (come nella corsa veloce) abbiamo visto che non può andare oltre i 20s in atleti campioni, quindi la contrazione cesserà prima che l'incremento del flusso ematico benefici la fibra che si contrae (figg. 7-22 e 7-24).

Le fibre adattate a questo tipo di contrazione sono quelle di tipo IIB, e si assume che diano il maggior contributo alla contrazione del muscolo che le contiene quando si contrae velocemente, essendo queste fibre capaci di produrre maggiori quantità di ATP nell'unità di tempo. Se la contrazione iniziale è moderatamente veloce o lenta, procederà anaerobiamente per 5-6 min. Successivamente il contributo anaerobio alla sintesi di ATP si riduce a favore della sintesi aerobia in relazione all'incremento dell'apporto di O₂. Quando il flusso ematico sarà aumentato al valore opportuno a sostenere la velocità delle

contrazioni del momento, l'ATP sarà prodotto aerobiamente da acidi grassi, glucosio ematico e glicogeno. Tuttavia anche in questa condizione se si faranno delle accelerazioni o si terranno velocità superiori alla soglia anaerobia (fig. 7-25), l'ATP richiesto in più alle capacità aerobie della fibra, sarà prodotto anaerobiamente dalla fibra stessa e/o perchè sono intervenute le fibre IIB.

Si assume che in uno stesso muscolo le contrazioni iniziali e molto veloci siano sostenute dalle fibre di tipo IIB, le contrazioni mediamente veloci prevalentemente dalle fibre di tipo IIA, e le contrazioni lente prevalentemente dalle fibre di tipo I. Questa distribuzione di ruoli si assume che sia determinata da specifici impulsi nervosi.

In accordo con ciò è il valore del patrimonio enzimatico delle varie fibre. Le fibre I e IIA hanno le attività massime della FFC inferiori (fig. 7-19) a quelle delle fibre IIB (nell'ordine IIB>IIA>I), per cui anche quando producono ATP anaerobiamente al massimo della loro capacità, lo producono in quantità inferiori a quelle massime delle fibre IIB e quindi possono contrarsi meno velocemente di queste (nell'ordine IIB>IIA>I). Quindi se l'inizio delle contrazioni o le accelerazioni sono tali da richiedere alte velocità di contrazione non realizzabili dalle fibre di tipo I, entrano in gioco le fibre IIA e se anche queste non sono sufficienti le fibre IIB. L'entrata in gioco del tipo di fibra dipende dalla stimolazione nervosa che giunge ai motoneuroni in relazione alla velocità di contrazione richiesto.

Durante lo sforzo prolungato, l'acido lattico prodotto dalle fibre di tipo IIB può essere in parte assunto dalle fibre di tipo I.

L'allenamento per sforzi prolungati (es. corsa di lunghe distanze), favorisce il metabolismo aerobico di tutti i tre tipi di fibra, incrementa la vascolarizzazione, fa aumentare le fibre di tipo I e diminuire quelle di tipo II e converte le fibre IIB in fibre IIA (fig. 7-19).

L'allenamento per sforzi brevi ed intensi (es. corsa di 100 m) porta ad un incremento delle fibre di tipo IIB.

Riassumendo:

La sintesi di ATP è anaerobia in:

- 1) Cellule prive di mitocondri (globuli rossi)
- 2) In tutti i tipi di fibra muscolare in contrazione isometrica
- 3) In tutti i tipi di fibre muscolari all'inizio della contrazione
- 4) Nelle fibre di tipo IIB in contrazione
- 5) Nelle fibre di tipo I e IIA quando la richiesta di ATP supera quella fornita per via aerobia in quel momento

1,2,4- il metabolismo è totalmente anaerobico

3- le contrazioni sono totalmente anaerobie nei primi 10 minuti

5- le contrazioni sono parzialmente anaerobie.

Fig. 7-23

Possibile funzione dei cicli di substrati nella regolazione del metabolismo (ipotesi proposta da Newsholme E.A., New Engl. J. of M. 302, 400, 1980).

Potenziamento della capacità di regolazione da effettore.

La velocità della glicolisi nei muscoli scheletrici varia dalle condizioni di riposo a quelle di scatto di circa 1000 volte: da circa 50 (riposo) a circa 50.000 nmoli/min · g T.F. (scatto).

Calcoli fatti da alcuni autori (me incluso), danno per le velocità di glicolisi (non di sintesi di ATP) circa 1 e 60.000 nmoli/min · g T.F. rispettivamente per fibre in riposo ed in contrazione rapida, con un incremento relativo di 60.000 volte. Tuttavia ciò non va contro l'ipotesi di Koshland (vedere dopo).

Questo forte incremento del flusso glicolitico non può essere raggiunto con la variazione delle C_{ss} dei metaboliti effettori (ATP, citrato, P-creatina, IMP, ecc.), perchè per ottenere l'incremento di 1000 volte del flusso glicolitico, le C_{ss} degli effettori dovrebbero variare alcune centinaia di volte e dovrebbero associarsi ai rispettivi enzimi cooperativamente (regolazione amplificata, vedere cap. 3). Invece, la maggiore variazione di C_{ss} osservata è circa quattro volte (P-creatina). Newsholme ha proposto che il potenziamento della regolazione da effettori avvenga mediante i cicli di substrati. In figura, viene preso in considerazione il ciclo di substrati F6P-1,6diP in relazione alla regolazione della glicolisi nelle fibre muscolari, dalle condizioni di riposo a quelle di scatto e di riposo dopo lo scatto.

La reazione FFC non è all'equilibrio e tende a raggiungerlo nella direzione della glicolisi; mentre, la reazione F1,6P-fosfatasi, anch'essa non all'equilibrio, tende a raggiungerlo nel senso opposto. La reazione FFC sintetizza F1,6diP utilizzando ATP e F6P, la reazione F1,6diP-fosfatasi idrolizza F1,6diP a F6P. Le due reazioni costituiscono il ciclo dei substrati F1,6diP-F6P, che se non fosse regolato, avrebbe come risultato netto l'idrolisi di ATP, formando ciclicamente F1,6diP e F6P.

a) Nelle fibre muscolari scheletriche, l'attività massima dell'enzima FFC è di circa 60 µmoli/min · g T.F. e quella dell'enzima F1,6diP-fosfatasi di circa 2 µmoli/min · g T.F. L'incremento della capacità di regolare la FFC e quindi la glicolisi, è determinato dal fatto che, anche in condizioni di riposo, l'attività della FFC è ridotta per azione della F1,6diP-fosfatasi. L'attività dell'enzima FFC non si annulla per azione degli effettori negativi e/o per riduzione della C_{ss} degli effettori positivi perchè le C_{ss} degli effettori non si annullano mai completamente pur subendo forti variazioni e variando coerentemente (es. C_{ss}-AMP aumenta quando C_{ss}-ATP diminuisce). Mentre l'attività della F1,6diP fosfatasi, riformando F6P da F1,6diP, può ridurre molto la sintesi del F1,6diP anche quando la FFC non è inibita al massimo dagli effettori. Le variazioni delle C_{ss} degli effettori che fanno aumentare l'attività FFCca, la portano a superare l'attività della F1,6diP fosfatasi,

causano un forte incremento della sintesi netta del F1,6diP e quindi della glicolisi. Per la presenza del ciclo di substrati, l'incremento netto di F1,6diP per variazione delle C_{ss} degli effettori, ha le caratteristiche di un effetto soglia. L'amplificazione della regolazione dipende direttamente dalla velocità del ciclo ed è proporzionale al rapporto "velocità del ciclo/velocità del flusso a valle del ciclo". Così più alta sarà la velocità del ciclo prima dell'attivazione di un enzima del ciclo (e/o inibizione dell'altro) da parte degli effettori e maggiore sarà la risposta all'azione operata dagli effettori.

b) In condizioni di riposo le attività della di FFC e di F1,6diP-fosfatasi sono ai loro valori minimi che in questo esempio sono assunti essere: 55 nmoli/min · g T.F. per la FFC (circa 1000 volte inferiore all'attività massima) e 5 nmoli/min · g T.F. per la F1,6diP fosfatasi (400 volte inferiore alla attività massima). Il flusso netto glicolitico è 50 nmoli/min · g T.F.

c) Anticipazione dell'esercizio. La conoscenza che dopo poco si dovrà svolgere dell'esercizio muscolare (nello sport, l'approssimarsi dell'inizio delle gare, nella vita, ad esempio quando si realizza che dobbiamo correre per prendere l'autobus, o dobbiamo reagire scappando o attaccando), determina una preparazione inconscia all'esercizio stesso che risulta in un incremento delle attività dei due enzimi, tuttavia in proporzioni diverse rispetto alla condizione di riposo.

L'attività FFC aumenta di circa 37 volte e passa a 2000 nmoli/min g · T.F., mentre l'attività F1,6diP-fosfatasi aumenta di circa 380 volte e raggiunge quasi i suoi valori massimi: 1950 nmoli/min · g T.F. (1950 nmoli ≈ 2 μmoli). Nonostante l'attivazione dei due enzimi, il flusso glicolitico rimane 50 nmoli/min · g T.F. perché il ciclo dei substrati gira al suo massimo e consuma 1950 nmoli di ATP/min · g T.F. senza produrre nessun lavoro perché l'esercizio muscolare non è ancora iniziato. Si ha solo produzione di calore. Questo è il costo dell'amplificazione della regolazione.

Newsholme ha proposto che i due enzimi siano attivati dalle catecolamine, in relazione al fatto che sono secrete in stati emotivi (ed anche dall'insulina e dai glucocorticoidi in altre condizioni, vedere dopo). Quando Newsholme fece questa ipotesi, non si conosceva ancora che la FFC muscolare era attivata da F2,6diP, la cui sintesi è stimolata dalle catecolamine (vedere figg. 7-9 e 7-21). Non è noto quale effetto abbiano le catecolamine sulla F1,6diP-fosfatasi muscolare.

d) Esercizio veloce (scatto). Dopo circa 6 secondi, il forte decremento della C_{ss}-P creatina, quello minore ma significativo della C_{ss}-ATP, l'incremento della C_{ss}-Pi, determinano una forte attivazione della FFC, la velocità del ciclo è dimezzata in favore di un forte incremento del flusso glicolitico che raggiunge le 50.000 nmoli/min · g T.F. Questo incremento non si sarebbe potuto realizzare per semplice attivazione della FFC nelle condizioni di riposo, cioè senza la preparazione descritta in c). Non è necessario che la F1,6diP-fosfatasi sia inibita affinché si abbia l'attivazione indicata, perché con l'attivazione della

glicogenolisi, della FFC e PC, il F1,6diP entra preferenzialmente nella glicolisi piuttosto che tornare a F6P. Da ciò la riduzione dell'attività F1,6diP-fosfatasi da 1950 a 1000 nmoli/min g T.F. La F1,6diP-fosfatasi è sensibile all'AMP, tuttavia nelle prime fasi dello scatto la C_{ss}-AMP varia poco anche se l'AMP viene prodotto. Può darsi che nelle fasi intermedio di una corsa di 200 m (circa 20s di atleti campioni) l'AMP entri in gioco, mentre IMP e NH₃ parteciperebbero alla regolazione nelle fasi intermedie della corsa (fig. 7-21). Terminato l'esercizio, si ha nella fibra un periodo di recupero nel quale si ha un consumo di O₂ superiore a quello necessario a mantenere la sintesi di ATP in un organismo a riposo, che è stato definito come "debito di O₂" o "recupero di O₂".

Il periodo di recupero di O₂ può essere diviso in tre fasi:

-Fase rapida, (non indicata in figura) in cui vengono riossigenate Mb, Hb e riformata P-creatina, nei loro rispettivi valori di riposo. Si assume che in questa fase la velocità del ciclo si riduca rapidamente ai valori indicati per la fase lenta, in conseguenza del ritorno ai valori di riposo delle C_{ss} degli effettori degli enzimi FFC e F6P-fosfatasi.

-Fase lenta, (e in figura). Nel fegato si ha la riconversione in glucosio del lattato prodotto durante l'esercizio, nelle fibre muscolari che si sono contratte si ha la risintesi di glicogeno da glucosio ematico. Tuttavia l'O₂ consumato è superiore a quello necessario a sintetizzare l'ATP per la gluconeogenesi. L'ipotesi è che l'O₂ assunto in più sia utilizzato per sintetizzare l'ATP distrutto nel ciclo dei substrati, che rimane attivo anche nelle fasi di recupero dopo l'esercizio.

-Fase ultra-lenta, (f in figura). Questa fase può essere lunga più di 8 ore dopo l'esercizio. L'O₂ consumato in più rispetto a quello necessario a realizzare la sintesi di ATP per l'organismo in riposo, è utilizzato nel ciclo di substrati che è ancora attivo anche se con attività ridotta. Nella fase lenta ed ultra lenta del recupero si può arrivare a perdere circa il 10% della quota giornaliera di calorie. In questo calcolo è stato considerato solo il ciclo F6P-F1,6diP, tuttavia nelle fasi di recupero esistono altri cicli di substrati che possono essere attivi e quindi essere responsabili del maggior consumo di O₂ osservato dopo l'esercizio (es. glicogeno-GIP nel fegato e muscolo).

Newsholme infatti ha esteso l'ipotesi della amplificazione della regolazione da effettori a tutti i cicli di substrati (glucosio-G6P; PEP-PIR-AOA; forme fosforilate e non fosforilate delle proteine regolate da ormoni, trigliceridi ed acidi grassi, proteine ed aminoacidi liberi, ecc.).

Newsholme ha proposto che i cicli di substrato siano coinvolti in vari aspetti del metabolismo:

1) Regolazione rapida. Esempi sono: la regolazione rapida della glicolisi, delle fibre muscolari (descritta sopra), dell'attivazione ormonale (fig. 7-9).

2) Controllo del peso corporeo. Si è riscontrato che pur assumendo con gli alimenti calorie in quantità molto diverse un giorno rispetto al precedente, non si osservano variazioni di peso corrispondenti. Se tutto l'eccesso calorico fosse convertito in lipidi, come la regolazione da

effettori ed ormonale indicano, con l'aumento di cibo ingerito si dovrebbe avere un aumento di peso corporeo. Invece, soggetti normali devono essere sovralimentati per tempi lunghi per aumentare di peso, e quando lo hanno raggiunto devono assumere più calorie per mantenere il loro stato obeso di quante ne chiedeva il mantenimento del peso normale; inoltre i soggetti normali devono assumere più calorie di quelle richieste da persone spontaneamente obese. Ciò è spiegato assumendo che le persone spontaneamente obese abbiano cicli di substrato più lenti rispetto ai cicli di substrato delle persone che hanno pesi corporei normali. Quindi negli obesi i carboidrati vengono più efficientemente convertiti in lipidi (questo vale anche per gli altri alimenti) perchè meno ATP viene bruciato nei cicli di substrati. Quindi una quantità minore di glucosio sarà ossidata per produrre ATP ed invece verrà utilizzata per la sintesi di trigliceridi. Se il solo ciclo di substrati $F6P \rightarrow F1,6diP$ di tutto il tessuto muscolare di un uomo di 70 Kg girasse al massimo per 24 h, trasformerebbe in calore il 50% di tutte le calorie assunte con i cibi dei tre pasti giornalieri (circa 3200 kcal per l'uomo e circa 2300 kcal per la donna).

3) Perdita di peso in condizioni di stati di stress. Negli stati emotivi o di stress si ha attivazione di vari cicli in conseguenza della liberazione nel sangue di catecolamine e quindi di glucosio ed acidi grassi. Il solo eccesso di questi due substrati promuove l'attività di vari cicli di substrati ($glicogeno \rightarrow GIP$, $G6P \rightarrow F1,6diP$, $PEP \rightarrow PIR \rightarrow AOA$, trigliceridi- $acil-CoA$, acidi grassi- $acil-CoA$, $acil-CoA \rightarrow acetil-CoA$). Se il ciclo $F6P \rightarrow F1,6diP$ fosse attivato per 5 minuti, 10 volte al giorno, si avrebbe la perdita di 56 Kcal (2% della dieta). La vita "moderna" causa frequenti stati di stress, piacevoli e spiacevoli, e liberazione di catecolamine. Per avere secrezione di catecolamine è sufficiente guidare l'auto nel traffico, discutere un argomento importante, discutere col condomino, sostenere un esame, esaminare un candidato, partecipare ad uno spettacolo piacevole, ad un gioco ecc., stati di stress che corrispondono a quelli del passato, come guardare una palude con coccodrilli e serpenti, sostenere un "argomento" con un gorilla o con un condomino di caverna, difendersi da un leone, infilzare una gazzella, trovare un rifugio sicuro, ecc.

4) Risposta termica all'alimentazione. Con l'introduzione dei cibi nell'organismo si ha un incremento della temperatura corporea, che è attribuito alla stimolazione della velocità dei cicli di substrati in conseguenza dell'aumento di concentrazione nei tessuti di glucosio, aminoacidi ed acidi grassi, che avviene durante l'assorbimento degli alimenti digeriti. Ci sono indicazioni che anche le catecolamine possano svolgere un ruolo nell'incremento della temperatura corporea durante l'introduzione di cibo. Nel ratto, durante l'alimentazione, si ha un aumento della nor-adrenalina nel sangue, ed una diminuzione nei periodi di digiuno. Le catecolamine avrebbero un ruolo importante nella regolazione della velocità dei cicli di substrati per controllare la velocità di degradazione e delle sintesi dei composti di

deposito. Se il ciclo F6P-F1,6diP del tessuto muscolare scheletrico di un uomo di 70 Kg aumentasse la sua velocità di circa il 10% durante i tre pasti quotidiani, sarebbero liberate come calore circa 33 Kcal. Con un effetto simile anche negli altri cicli (glicogeno-GIP, trigliceridi-acidi grassi, ecc.), si arriverebbe alla perdita di circa 10% di calorie assunte con la dieta giornaliera. Newsholme ha proposto che i livelli relativi di insulina e di catecolamine, siano responsabili della regolazione della velocità dei cicli futili nei tessuti e della risposta termica all'alimentazione.

Sommario.

La funzione principale dei cicli di substrati è quella di regolare il metabolismo. In relazione diretta alla velocità del ciclo (velocità che il ciclo ha prima dell'attivazione la via metabolica in cui è inserito) si ha una amplificazione della regolazione da effettori e quindi anche una risposta più rapida. Maggiore è la velocità del ciclo, maggiore è l'amplificazione della regolazione, e maggiore è la perdita di energia (ATP) sotto forma di calore. L'ipotesi dei cicli futili spiega la forte attivazione della glicolisi negli scatti muscolari, ed il collegamento dei cicli di substrati con la produzione di calore suggerisce che la regolazione della velocità dei cicli di substrati deve avere un ruolo anche nella conservazione del peso corporeo (gli alimenti persi come calore non ingrassano). L'ipotesi dei cicli futili spiega la perdita di calore che avviene durante il riposo dopo l'esercizio, in stati di stress e con l'assunzione di cibo. L'ipotesi dei cicli di substrati spiega come con l'introduzione quotidiana dello stesso numero di calorie (come alimenti), un individuo con velocità di cicli di substrati normale, mantenga un normale peso corporeo, mentre un altro con una bassa velocità di cicli di substrati guadagni peso. Inoltre se si assumono calorie sotto forma di carboidrati al posto di lipidi, si dice che il metabolismo diviene più dinamico; infatti i carboidrati sono metabolizzati più velocemente dei grassi ed i cicli della glicolisi girano più velocemente di quanto possano fare i cicli di substrati lipidici. Risulta evidente che mangiando relativamente poco, i cicli vanno più lentamente e per tempi più brevi, ma anche i valori della sintesi netta di lipidi (su cui converge l'eccesso calorico degli alimenti) decrescono. Quindi con cicli di substrati lenti o veloci il sistema migliore per non ingrassare è mangiare lo stretto necessario.

catecolamine $\rightarrow \rightarrow$ F2,6diP F6P F1,6diP P_i AMP ATP P-creatina

Fig. 7-23

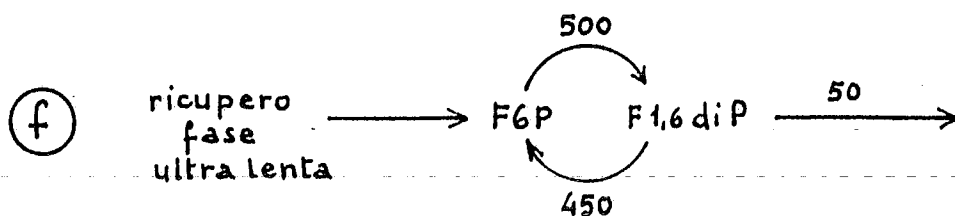
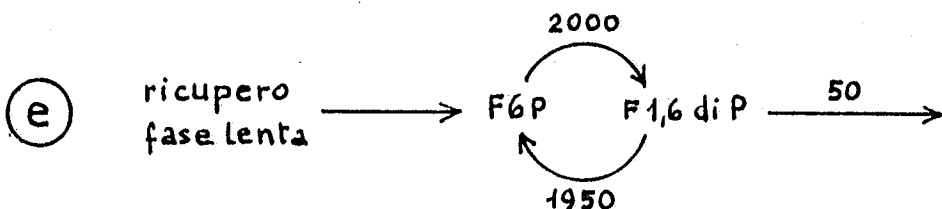
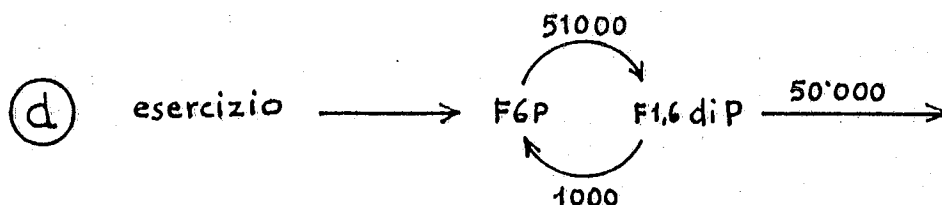
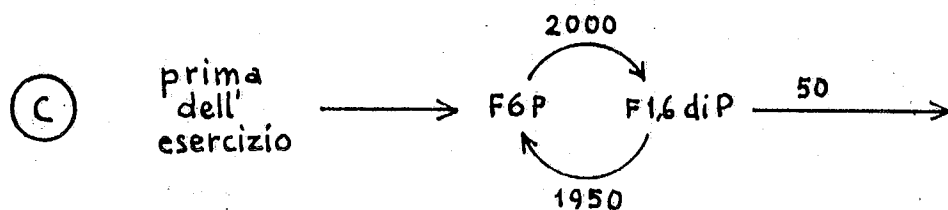
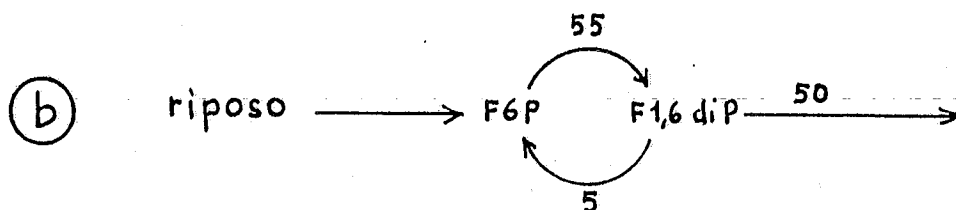
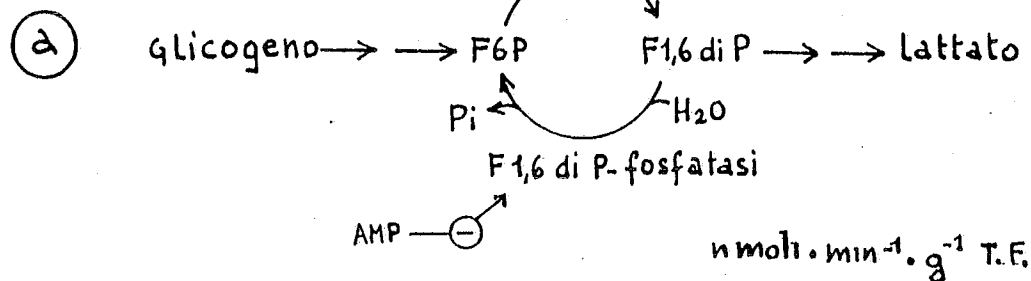


Fig. 7-24

Alcune caratteristiche biochimiche della corsa dell'uomo.

a) Corsa veloce.

I muscoli delle gambe degli atleti campioni di corsa veloce sono più del 70% di tipo IIB. I dati in figura indicano che nella corsa veloce la fatica non è causata da mancanza di glicogeno. Il contenuto di glicogeno nella fibre potrebbe sostenere anaerobicamente una corsa veloce di 80s (dopo circa 40s di corsa veloce nelle fibre è presente ancora il 50% del glicogeno), mentre la fatica subentra prima di 40s a causa dell'incremento di protoni (riduzione del pH) nella fibre.

I campioni di velocità percorrono i 100 m in circa 10s, 200 m in 20s, ma impiegano più di 40s a percorrere i 400 m. Da ciò si è dedotto che dopo 20s e prima di 40s la fibra inizia a contrarsi più lentamente perché è entrata in fatica, pur avendo ancora riserva glucidica. Lo stato di fatica è imputato ad un incremento del pH (vedere anche fig. 7-22b). Le variazioni di pH e di lattato nel muscolo indicate in figura provengono da esperimenti in cui si è causato fatica nel muscolo quadricipite (gamba) con 3 corse veloci di 1 minuto, separate da 1 minuto di riposo. In figura si assume che un simile stato di fatica sia raggiunto tra i 200 ed i 300 m di corsa veloce di atleti allenati.

b) Corsa su lunghe distanze.

In tratteggio - doppio punto la linea di base della variazione %. Tratteggio e tratto punto: dati estrapolati (indicano l'andamento del fenomeno). I muscoli delle gambe di atleti campioni di corse sulle lunghe distanze sono più del 70% di tipo I. All'inizio (5-10 min) la corsa è anaerobia (fig. 7-21), poi quasi esclusivamente aerobia. Il 40-60% della sintesi di ATP avviene per ossidazione di acidi grassi ed il resto da glucosio ematico e glicogeno. I combustibili usati durante il riposo (91% acidi grassi e 9% glucosio) sono indicati prima del tempo zero. Le corse su lunghe distanze hanno una componente aerobia che varia in relazione alle velocità sostenute dall'atleta (vedere dopo e figg. 7-22, 7-25, 7-26). Dopo l'inizio della corsa si ha secrezione di catecolamine che stimolano l'attività glicogenolitica nel fegato, nel tessuto muscolare e lipolitica nel tessuto adiposo. Dopo 30-40 min aumenta la CSS-acidi grassi. Dopo circa 10-40 min. di corsa, in relazione all'abbassamento della glicemia, si ha riduzione delle CSS-insulina e incremento della CSS-glucagone nel sangue. Il glucagone stimola la glicogenolisi e la gluconeogenesi epatica. La formazione dei corpi chetonici è scarsa perché si ritiene che gli acidi grassi siano utilizzati quasi esclusivamente dalle fibre che si contraggono e dal fegato per operare la gluconeogenesi (sintesi di ATP, inibizione della glicolisi, vedere fig. 7-2). La fatica nelle corse su lunghissime distanze subentra quando le riserve di carboidrati sono esaurite (2-12 h a seconda della velocità di corsa sostenuta da atleti allenati) perché con l'ossidazione degli acidi grassi non si può produrre, con la stessa velocità, la stessa quantità di ATP e quindi si è costretti a diminuire il passo e poi a

fermarsi.

Altre cause portano alla fatica: esaurimento della volontà di correre, tendini e pelle che divengono doloranti per le troppe sollecitazioni, ecc. Gli atleti campioni percorrono la maratona in poco più di 2 h. Si ritiene che al termine della gara le loro riserve di glicogeno epatico e delle fibre che si sono contratte, siano quasi o totalmente esauriti. Per questi atleti l'evoluzione dei parametri biochimici è simile ma più rapida di quella indicata dal diagramma b. Si ritiene che, durante la maratona (che è corsa più velocemente di una corsa di 4h) avvenga in 2h, ciò che nel grafico è indicato avvenire in 4h. Il costo energetico di una maratona (42,2 Km percorsi dai campioni in poco più di 2 h), è circa 20 Kcal/min equivalenti a circa 2800 kcal per tutta la corsa. Se percorsa in 2 h 30'+2h 50' la spesa energetica è circa la stessa. 2800 kcal sono più di 2/3 della richiesta calorica di 1 giorno.

Si ritiene che le corse "lente" su lunghe distanze siano sostenute da ATP prodotto al 100% in aerobiosi, tuttavia si osserva un piccolo incremento della lattemia che denuncia attività glicolitica anaerobia (questa figura b, fig. 7-25). Questo è spiegato in vari modi: 1) un po' di acido lattico è sempre prodotto perchè la reazione LDH è una via aperta anche in fibre che si contraggono in aerobiosi. Per cui, anche se la corsa è sostenuta da ATP sintetizzato in aerobiosi, più alta è la velocità e/o più è lunga la corsa, più piruvato è convertito in acido lattico ed entra nel sangue; 2) anche nelle contrazioni "lente" si contraggono alcune fibre di tipo IIB; 3) l'atleta non riesce a mantenere costante la velocità di corsa, compie ogni tanto piccole accelerazioni e quindi produce acido lattico; 4) al termine della contrazione "lenta" e prima dell'allungamento del muscolo, nonostante la presenza della Mb-O₂, si realizzano condizioni di deficit di O₂ simili a quelle delle contrazioni isometriche.

In corse sulla media distanza, il contributo anaerobio è in relazione diretta alla velocità di corsa ed in relazione inversa con la lunghezza della corsa (7-26). Questo perchè l'atleta corre oltre la soglia anaerobia, cioè mantiene una velocità di corsa superiore ai 20 Km/h che non può essere sostenuta solamente con la sintesi aerobia di ATP. Poichè la fibra, che sintetizza ATP per via anaerobia, utilizza quasi esclusivamente glicogeno in essa contenuto, che è una riserva limitata, più velocemente correrà l'atleta, minore sarà la distanza che potrà percorrere a quella velocità. I muscoli dell'atleta che corre sintetizzano ATP con tutta la loro capacità aerobia, e con la glicolisi anaerobia sintetizzano l'ATP in più che occorre per sostenere la maggiore velocità di corsa. Il dosaggio dell'attività anaerobia, che dipende dalla velocità di corsa che l'atleta vuol tenere, è molto importante. Se l'attività anaerobia è eccessiva, l'atleta rischia di finire la riserva di glicogeno nelle fibre che si contraggono (cioè di entrare in fatica) prima di essere giunto al traguardo. Mancando il contributo anaerobio alla sintesi di ATP, le fibre non possono più produrre ATP con la stessa velocità e devono ridurre la frequenza delle loro contrazioni in relazione alla ridotta velocità di sintesi di ATP. Tuttavia, se per

prudenza l'atleta mantiene una velocità di corsa che utilizza relativamente poco la glicolisi anaerobia, arriva al traguardo con ancora la riserva di glicogeno nelle fibre che si contraggono. Tuttavia avrà percorso la distanza di corsa in un tempo maggiore di quello che avrebbe realizzato se avesse utilizzato una quantità maggiore di glicolisi anaerobia, che gli avrebbe permesso una velocità di corsa maggiore.

Questa relazione inversa tra velocità e durata della corsa è una causa di imprevedibilità dei risultati personali degli atleti (records per i campioni). Consideriamo un solo fattore: la riserva di glicogeno nelle fibre prima della corsa. Essa può variare in relazione all'alimentazione, durata e tipo di allenamento, stato di salute e stati emotivi precedenti la corsa, per cui l'atleta non è mai sicuro al 100% di poter sostenere una corsa alla velocità con la quale aveva percorso la stessa distanza in tempi precedenti, anche recenti.

In genere, gli atleti arrivano in prossimità del traguardo con ancora una riserva di glicogeno che permette loro di sintetizzare per via anaerobia, e quindi rapidamente, una quantità di ATP per l'accelerazione finale, se necessaria. Ciò è adottato anche come tattica di corsa al fine di avere sempre la possibilità di evitare sorpassi da parte di altri atleti sul filo del traguardo.

Una dieta ricca di carboidrati nei tre giorni precedenti la corsa (o sforzo fisico) raddoppia la riserva di glicogeno nelle fibre, allunga il tempo di comparsa della fatica di circa il 40%.

L'utilizzazione della glicolisi anaerobia per completare la richiesta di ATP necessaria a sostenere la velocità della corsa, causa un rilascio di lattato nel sangue che è in proporzione diretta all'impiego della glicolisi anaerobia. Quindi la C_{ss}-lattato nel sangue sarà più alta negli atleti che corrono corse di media distanza più brevi (es. 1000-5000 m), perchè più veloci rispetto a corse più lunghe (es. 10.000 m) che per essere ultimate devono essere percorse a velocità più basse.

L'acido lattico è la spia della acidificazione delle fibre; il pH acido è il fattore responsabile della fatica nelle contrazioni anaerobie (a e fig. 7-22), quindi l'atleta che corre le medie distanze, oltre ad una buona capacità di sintesi aerobia di ATP, deve avere anche un'ottima capacità di mantenimento del pH delle fibre per tamponamento e/o per esportazione di protoni dalla fibre.

L'atleta campione della media distanza deve avere anche il sangue, fegato e reni con un'ottima capacità tamponante per evitare la fatica da acidità (fig. 7-22b). Inoltre l'atleta potrà utilizzare più glicogeno per la glicolisi anaerobia (che corrisponde ad una velocità di corsa maggiore) se è anche dotato di ottima capacità gluconeogenetica (nel fegato (soprattutto) e nei reni) che converta lattato, alanina e glicerolo in glucosio, in modo che la glicemia sia mantenuta più a lungo possibile alta e venga risparmiato glicogeno della fibre che si contraggono. Il glucosio ha un effetto inibitorio sulla glicogeno-fosforilasi a (favorisce la sua conversione nella forma b, fig. 7-9).

Gli atleti campioni percorrono la corsa di 5000m in un tempo

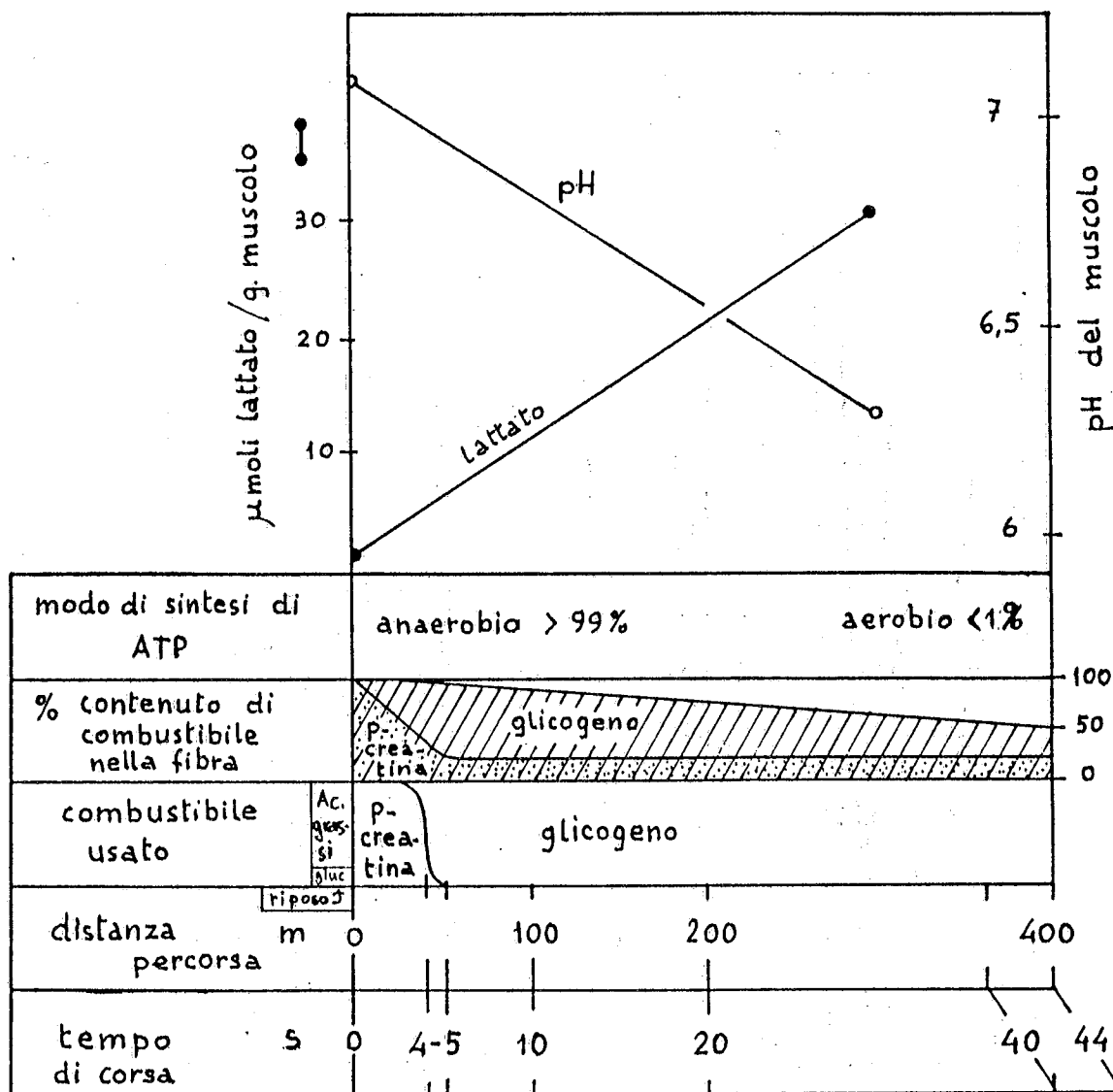
relativamente breve (circa 15 min) sintetizzando ATP prevalentemente per via aerobia e con una significativa componente anaerobia (10-20%). Data la brevità del tempo di corsa, teoricamente la corsa potrebbe essere percorsa con soli carboidrati. Tuttavia per avere maggiore disponibilità di glicogeno o glucosio da utilizzare per la sintesi anaerobia dell'ATP, può essere utile che gli acidi grassi contribuiscano alla sintesi dell'ATP.

La condizione di fatica sulle lunghe distanze è basata sull'esaurimento della riserva di glicogeno nelle fibre che si contraggono. Il depauperamento della riserva di glicogeno è rallentato se il fegato riesce a mantenere più a lungo possibile livelli normali di glicemia (con la sua riserva di glicogeno e con la gluconeogenesi). Infatti, l'utilizzazione del glicogeno delle fibre che si contraggono lentamente come nelle corse su lunghe distanze, è in relazione ad un insufficiente apporto di glucosio dal sangue, causato da un livello non ottimale di glicemia.

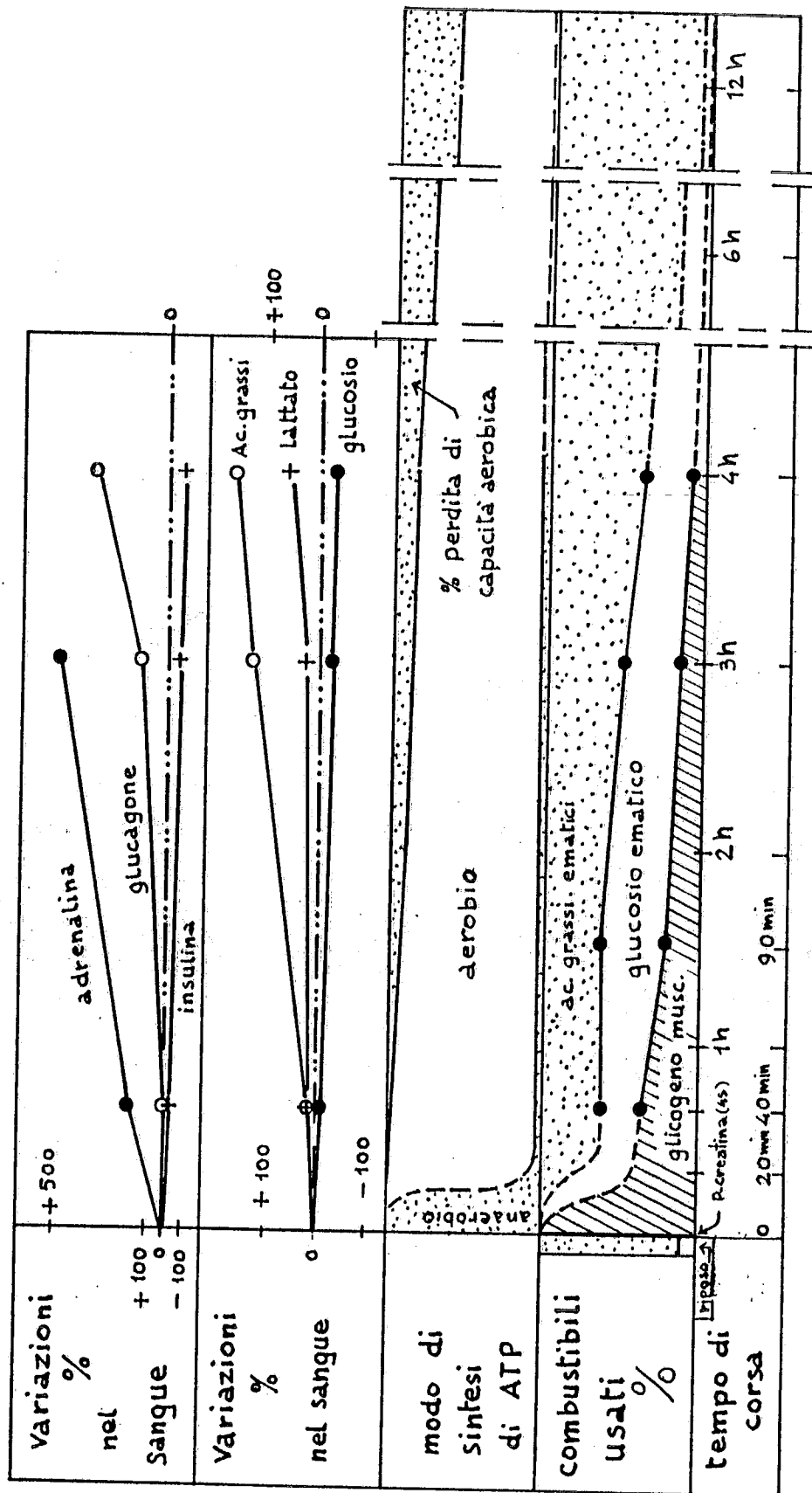
Quando la riserva di glicogeno nelle fibre non è più utilizzabile, subentra la fatica e l'atleta è costretto a rallentare. Si assume che il glicogeno non si esaurisca mai completamente, altrimenti durante il riposo non si potrebbe risintetizzare per assenza di primer. Anche durante la corsa in stato di fatica, la gluconeogenesi epatica continua (la riserva di glicogeno epatico si è esaurita, prima di quella delle fibre muscolari) per sostenere la glicemia ed evitare un rallentamento delle funzioni delle cellule nervose. In queste condizioni, se l'atleta continuasse a correre come prima, causerebbe una riduzione della glicemia non compatibile per il normale metabolismo delle cellule nervose. Riducendo la velocità di corsa in modo da utilizzare solo acidi grassi, l'atleta evita il collasso.

a

Fig. 7-24



corsa veloce



(b)

Fig. 7-24

Fig. 7-25

Relazione tra velocità della corsa su lunghe distanze, battito cardiaco e produzione di acido lattico. (Ridisegnato da Conconi ed altri, J. App. Phys. 52 (4), 869, 1982).

a) Il grafico mostra che con l'aumentare della velocità della corsa da 12 Km/h, si ha un incremento lineare del battito cardiaco, fino ad una certa velocità oltre la quale la linearità è persa. La velocità di corsa (V_d) alla quale corrisponde la perdita della linearità, è anche quella della soglia anaerobia (AT). Cioè oltrepassando la V_d , che è sostenuta dalla sintesi aerobia dell'ATP, le fibre devono sintetizzare ATP via glicolisi anaerobia, al fine di mantenere la maggiore velocità, poichè l'apporto di O_2 non aumenta in proporzione alla richiesta di O_2 . Questo è reso evidente dal forte incremento delle C_{ss}-lattato nel sangue con l'aumentare della velocità di corsa dopo la V_d .

Le misure sono state fatte su atleti che correvano costantemente alle velocità indicate per 1200 m, raggiunte gradualmente per evitare la produzione di lattato dovuto al deficit di O_2 . Prima e 5min dopo la corsa era prelevato il sangue per dosare il lattato. Misure della velocità su tratti di corsa più brevi o più lunghi non variava in risultato. I battiti cardiaci erano misurati continuamente.

b) Il grafico mostra che con l'allenamento la soglia anaerobia si sposta a velocità più alte.

Curva 1. Atleta al primo rilevamento dei dati.

Curva 2. Dopo 2 mesi di allenamento.

Curva 3. Dopo 4 mesi di allenamento.

Quindi l'allenamento aumenta le capacità di sintesi aerobica di ATP, per cui si alza il valore della V_d .

Dopo il periodo di allenamento, l'atleta può correre in aerobiosi a velocità più alta, oppure può correre alla stessa velocità con una frequenza cardiaca (battiti/min) inferiore. L'allenamento ha reso i muscoli che si contraggono nella corsa più efficienti nell'assumere O_2 e glucosio, e nel sintetizzare da questi ATP e concomitantemente ha migliorato l'apporto di O_2 e metaboliti e la circolazione del sangue.

Risulta evidente che mantenersi allenati è anche un modo per far lavorare meno il cuore per compiere lo stesso sforzo muscolare, e ciò è utile anche nella normale vita quotidiana.

L'atleta allenato va in V_d e quindi in anaerobiosi con una frequenza cardiaca inferiore a quando non è allenato. Ciò è spiegato considerando che nell'atleta allenato, il volume di sangue trasferito (gittata cardiaca) è maggiore, per cui pur avendo alla V_d una frequenza cardiaca inferiore, ha una ossigenazione superiore rispetto allo stesso atleta non allenato.

c) L'atleta era già allenato (curva 1), con due mesi di

allenamento (curva 2) ha migliorato la prestazione, con lo stesso numero di battiti/min può correre più veloce. Dopo circa 1 mese, i benefici dell'allenamento erano persi (curva 3). La ragione fu individuata dopo pochi giorni, quando fu riscontrato che l'atleta era affetto da mononucleosi infettiva.

Quindi la perdita di salute è anche perdita di allenamento, e dopo essere guarito, per riottenere le condizioni originali, occorre un altro periodo di allenamento.

I dati di questi esperimenti hanno una grande utilità pratica, perchè avendo stabilito che esiste una precisa corrispondenza tra la velocità (Vd) e la soglia anaerobica (AT), è sufficiente far correre agli atleti tratti di circa 1000 m con velocità progressivamente più alte e misurare la loro frequenza cardiaca. La velocità alla quale si vede che è persa la linearità tra frequenza cardiaca e velocità di corsa è la Vd. Quindi è possibile stabilire la velocità della soglia anaerobica senza usare metodi invasivi (prelievo del sangue, biopsia, ecc.).

Questo test (misura precisa del battito cardiaco a velocità di corsa diverse) è detto di Conconi, dal nome del ricercatore che con il suo gruppo di lavoro ha condotto gli esperimenti per arrivare alla definizione dei parametri del test mostrato in figura.

Il test si è mostrato utilissimo per allenare opportunamente atleti, soprattutto per conoscere la velocità che un atleta può sostenere per percorrere distanze molto lunghe. Un atleta che corre al disotto della sua Vd, sa che allontana il momento in cui entrerà in fatica, perchè per tutta la corsa userà il minimo di riserva di glicogeno delle fibre che si contraggono, per mantenere la velocità con cui corre.

Il test dà anche altre utili indicazioni. Gli atleti che corrono i 5000m attingono a circa il 10% di glicolisi anaerobica. Questi atleti durante la corsa sostengono velocità che sono superiori di poco (6%) alla Vd senza però subire immediate conseguenze, cioè rapida caduta del contenuto di glicogeno delle fibre e l'acidificazione della fibra, e l'incremento della C_{ss}-lattato nel sangue. Sottoponendo atleti interessati a percorrere i 5000m al test di Conconi e stabilita la loro Vd, si può consigliare loro di allenarsi superando di circa il 6% (3-9%) la Vd. Essi avranno l'utile indicazione per percorrere completamente i 5000m alla velocità massima possibile, considerato il loro stato atletico del momento.

Si assume che questi atleti, pur producendo una quota di ATP via glicolisi anaerobia, riescono a mantenere la C_{ss}-lattato nel sangue più bassa mediante un ciclo di Cori reso più veloce da una migliore vascolarizzazione della muscolatura e maggiore capacità gluconeogenetiche del fegato e reni.

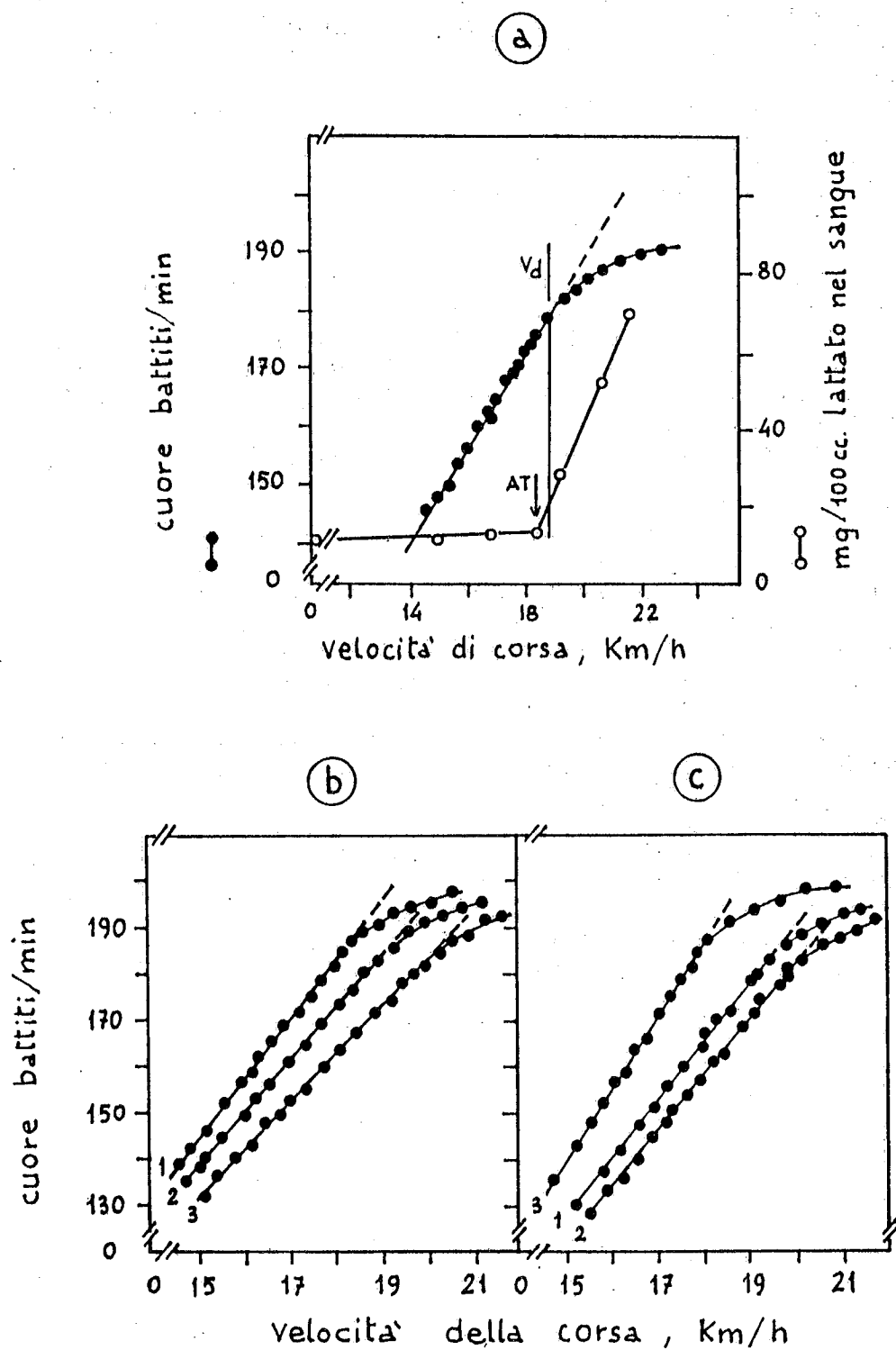


Fig. 7- 25

Fig. 7-26

Il grafico indica la percentuale di metabolismo anaerobio (sintesi di ATP) nelle fibre muscolari durante la corsa su distanze diverse, dai 100 m fino ai 42.200 m della maratona.

Sull'ordinata è indicato il % della sintesi anaerobia di ATP nelle fibre muscolari che si contraggono.

Si assume che la corsa dei 100 m sia completamente (100%) anaerobia e la maratona completamente aerobia (0%).

Sulle ascisse è indicata la velocità della corsa (km/h) e le frecce indicano le velocità record delle varie distanze di corsa. L'incontro tra le ordinate e la retta che unisce il 100% di metabolismo anaerobio con lo 0% di metabolismo anaerobico della maratona (19,9 km/h), indica approssimativamente il % di metabolismo anaerobio delle fibre muscolari che si contraggono per conferire quella data velocità di corsa.

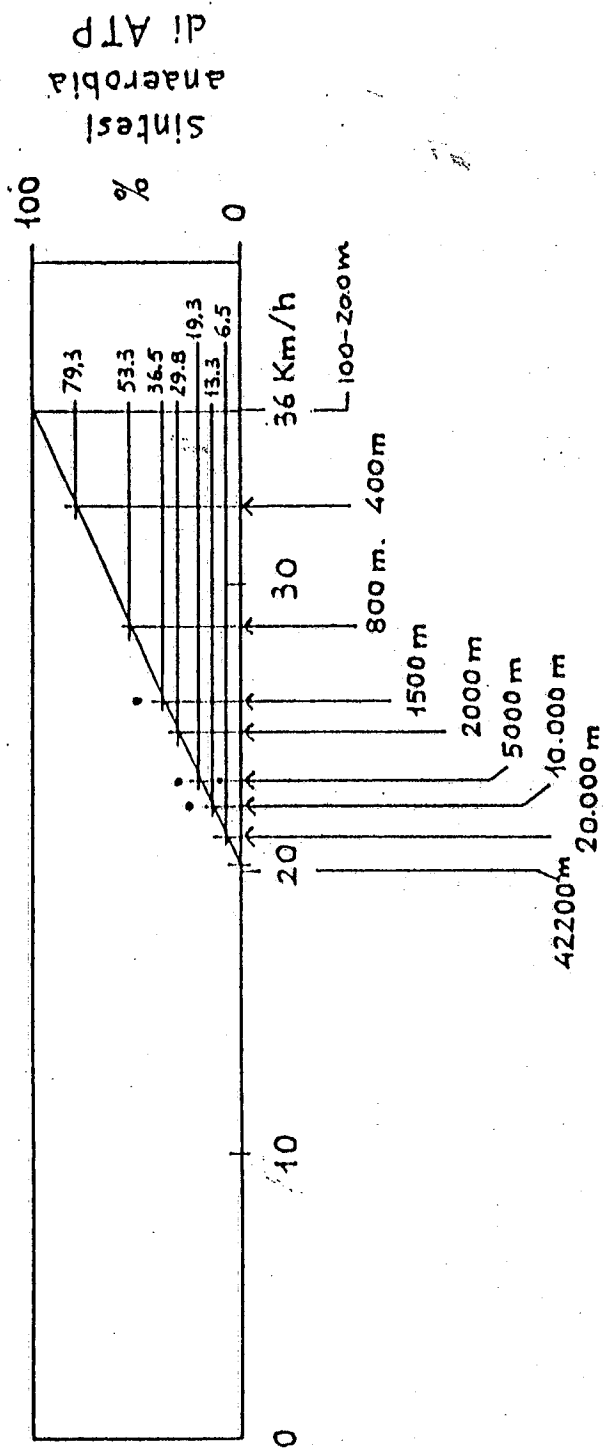
Le velocità si riferiscono a records di corsa degli anni 1970-80.

Il grafico mostra che gli atleti campioni, che nelle rispettive specialità corrono con velocità superiori ai 19,9 km/h, oltre all'ATP sintetizzato aerobicamente, ne sintetizzano anche anaerobiamente in quantità proporzionalmente maggiori in relazione alle velocità che vengono sostenute fino alla velocità di 36 km/h in cui l'ATP è quasi totalmente (>99%) sintetizzato in anaerobiosi.

Poiché le velocità considerate sono quelle record, esse sono anche le velocità massime a cui si può percorrere le distanze corrispondenti al record, e corrispondono anche le distanze alle quali si arriva in condizioni molto vicine alla fatica. Velocità massima, tipo di metabolismo per produrre ATP (aerobio-anaerobio), distanza percorsa alla velocità massima, sono collegati.

I punti sul grafico indicano i valori percentuali di metabolismo aerobio calcolati con metodi diversi.

Fig. 7-26



BIBLIOGRAFIA

Libri.

1. Biochemistry, Stryer L., 1988, 3rd Ed., Freeman, New York.
2. Biochemistry for the Medical Sciences, Newsholme E.A. e Leech A.R., 1983, Wiley, New York.
3. Chemical Principles, Dickerson R.E., Gray H.B., Haight G.P. Jr., 1974, 2nd Ed., Benjamin, Menlo Park, Ca.
4. Enzimi: meccanismi di catalisi e meccanismi di regolazione, Gabrielli F., 1979, Piccin, Padova.
5. Enzymes in Metabolic Pathway, Saier M.H. Jr., 1987, Harper & Row, New York.
6. Fundamentals of Enzymology, Price N.C. e Stevens L., 1982, Oxford University Press, New York.
7. General Chemistry, Pauling L., 1970, 3rd Ed., Freeman, San Francisco, Ca.
8. Hemoglobin, Dickerson R.E. e Geis I., 1983, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Ca.
9. Hormones, Norman A.W. e Liwack G., 1987, Academic Press, New York.
10. La regolazione nel metabolismo (struttura, termodinamica e regolazione della via metabolica), Gabrielli F., 1978, Piccin, Padova.
11. Modificazioni post-traduzionali delle proteine, Gabrielli F., Querci B., Bolognani L., 1983, Piccin, Padova.
12. Molecular Biology of Gene, Watson J.D., Hopkins N.H., Roberts J.W., Steitz J.A., Weiner A.M., 1987, 4th Ed., Benjamin/Cummings, Menlo Park, Ca.
13. Molecular Biology of the Cell, Alberts B., Bray D., Lewis J., Paff M., Roberts K., Watson J.D., 1988, 2nd Ed., Garland, New York.
14. Molecular Endocrinology, Bolander F. F., Academic Press, New York.
15. Outlines of Enzyme Chemistry, Neillands J.B. e Stumpf P.K., 1965, 2nd Ed., Wiley, New York.
16. Physical Chemistry, Eisenberg D., Crothers B., 1979, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Ca.
17. Principles of Biochemistry, Lehninger A.L., 1982, Worth, New York.
18. Regolazione della sintesi delle proteine. Controllo della traduzione, Gabrielli F., Salvini M., 1982, Piccin, Padova.
19. Regulation in Metabolism, Newsholme E.A., Start C., 1973, Wiley, New York.
20. Review of Medical Physiology, Ganong W.F., 1971, Lange, Los Altos, Ca.
21. Struttura e meccanismi d'azione degli enzimi. Ferst A., 1989, Zanichelli, Bologna.
22. The Enzyme Molecule, Ferdinand W., 1976, Wiley, New York.
23. The Metabolic Basis of Inherited Disease, Stambury J.B., Wyngaarden J.B., Fredrickson D.S., Goldstein J.L., Brown M.S., 1983, 5th Ed., Mc Graw Hill, New York.
24. Understanding Enzymes, Palmer T., 1981, Horwood, Chichester, England.